

MASTEROPPGAVE

Emnekode: BIO5002

Navn på kandidat: Carl Ruben Ærø

**Kontinuerlig lysstimuli og sjøvannsbruk i intensiv smoltproduksjon:
smoltifiseringsutvikling hos Atlantisk laks (*Salmo salar*)**

Continuous light stimuli and use of seawater in intensive smolt production:
smolt development in Atlantic salmon (*Salmo salar*)

Dato: 14.05.18

Totalt antall sider: 81

Sammendrag

Smoltifisering er en morfologisk, fysiologisk og atferdsmessig prosess ung Atlantisk laks (*Salmo salar*) gjennomgår i ferskvann for å forberede seg på opphold i sjøvann. Endring i daglengde (fotoperiode=lyspeperiode) er en avgjørende faktor for igangsetting av prosessen. Vanntemperatur påvirker hastigheten på smoltifiseringsforløpet. På settefiskanlegg i kommersielt oppdrett av Atlantisk laks styres fisken inn i smoltifiseringsprosessen ved å simulere endring i daglengde ved hjelp av lysprogrammer. En mer intensiv produksjon med høy vanntemperatur, bruk av brakkvann og kontinuerlig lys har blitt vanligere etter år 2000. Hovedmålet med denne oppgaven var å kartlegge smoltifiseringstrekk hos ung Atlantisk laks (parr) på et settefiskanlegg hvor produksjonsbetingelsene var som nevnt over. Samtidig var et delmål å vurdere hvorvidt de ulike metodene som brukes for å dokumentere smoltifisering i kommersielt lakseoppdrett gir et godt nok grunnlag for å avgjøre tidspunkt for sjøutsett. Det ble gjort fem prøveuttak (A (Mars; 2,6 gram) til E (Juli; 79 gram)) fra produksjonskar på settefiskanlegget. Sjøvannstester ble utført på hvert uttak. Ved de to første uttakene hadde ikke fisken utviklet sjøvannstoleranse, vist ved tidlig og høy dødelighet i sjøvannstest. Sjøvannstest uttak C og D viste at fisken hadde utviklet sjøvannstoleranse, mens det var en dødelighet på 17 % i sjøvannstest ved uttak E. Morfologisk hadde all fisken utviklet smoltkarakterer ved uttak E (blank uten parmerker), mens deler av gruppen hadde et slikt utseende allerede ved uttak A (31 %). Plasmaklorid hos fisk fra produksjonskar ved uttak B og C var lavere enn hva som normalt observeres hos parr, mens nivået steg til normale nivåer ved uttak D og E. Plasmamagnesium og plasmaosmolalitet for fisk i produksjonskar var innenfor normale nivåer ved alle uttak. Gjelle NKA-enzymaktivitet steg signifikant fra uttak A til B, B til C og holdt høyt nivå ved resterende uttak. Gjelle mRNA-uttrykk viste en relativ reduksjon i NKA α 1a fram til uttak C. Ved uttak D var den relative reduksjonen liten, mens den var signifikant større igjen ved uttak E. Gjelle mRNA-uttrykk av NKA α 1b viste en svak relativ økning fram til uttak C, for deretter å være stabil. Differansen mellom de to isoformene både ved uttak C og E samsvarer med det som tidligere er observert hos smoltifisert Atlantisk laks. Dødelighet i sjø etter utsett var lav sammenliknet med gjennomsnittlig dødelighet for smolt nasjonalt. Resultatene viste parr som smoltifiserte mellom uttak B og C (april, 7,4 -16,7 gram), men fikk problemer med sjøvannstoleranse i juli. For å få et best mulig bilde av laksens smoltifiseringsstatus bør metodene som brukes i kommersielt oppdrett av Atlantisk laks kombineres. Kontinuerlig lys kombinert med høy vanntemperatur (14/12,6 °C) og brakkvann (5-14‰) gir i dette tilfellet smoltifisert laks på et tidlig tidspunkt i produksjonssyklusen.

Summary

Smoltification is a morphological, physiological, and behavioural process juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoes in freshwater to prepare a stay in seawater. Change in daylength (photoperiod) is the main factor that starts the process, while temperature influence the speed of smolt-development. In commercial smoltfarms, Atlantic salmon have their photoperiod altered by different light-programs to initiate smoltification. Since year 2000, a more intensive production with high water temperatures, use of brackish water and continuous light stimuli have been more common. The main objective of this study was to investigate smoltification traits in juvenile Atlantic salmon (parr) on a smoltfarm where the production conditions was as mentioned above. A secondary objective was to examine whether different methods used to decide smoltification in commercial Atlantic salmon aquaculture provides a good enough basis to decide time of sea transfer. Five samplings were done (A (March; 2,6 gram) to E (July; 79 gram)) from production tanks on the smoltfarm. 24-hour seawater challenge test (SWT) were run on each sampling. On the two first samplings (A, B) the fish did not survive the SWT, while the fish at sampling C and D displayed seawater tolerance. There was 17 % mortality in SWT at sampling E, where all the fish had developed morphologically smolt-characteristics (silver coloured without parr marks). In sampling A 31% of the fish was silver coloured without parr marks. Plasma chloride in fish from production-tanks at sampling B and C was lower than normally observed in parr but increased to normal values at sampling D and E. Plasma osmolality and plasma magnesium was within normal values in fish from production tanks in all samplings. Gill $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase (NKA)-enzyme activity increased significantly from sampling A to B, B to C and was high in the remaining samplings. Gill mRNA-expression shown relatively reduction in NKA α 1a until sampling C. In sampling D, the relative reduction was small, while it was significantly increased in sampling E. Gill relative mRNA-expression of NKA α 1b increased slightly until sampling C, and then remained stable. The difference between the two isoforms in both sample C and E, correspond with earlier observations in smoltified Atlantic salmon. Mortality after sea transfer was low in comparison with national average smolt mortality. The results show that the fish smoltify in April between sampling B and C (7,4 -16,7 gram), but displayed poorly seawater tolerance in July. To get the best possible picture of the smoltification status, the different methods used in the commercial Atlantic salmon aquaculture should be combined. Continuous light combined with high water temperature (14/12,6 °C) and brackish water (5-14‰) provides in this case smoltified salmon at an early point in the production cycle.

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet som en avsluttende del av et masterstudium i Biologi og Akvakultur ved fakultet for biovitenskap og akvakultur, avdeling Bodø. Arbeidet har pågått fra mars 2017 til mai 2018. Oppgaven teller 60 studiepoeng.

Jeg vil takke min hovedveileder, førsteamanuensis Thorstein Kristensen, for at jeg fikk et masterprosjekt som ga meg muligheten å jobbe tett på oppdrettsnæringen. Dette har lært meg mye. Jeg vil og takke for inspirerende diskusjoner og god faglig veiledning underveis. Førsteamanuensis og medveileder Martin Haugmo Iversen skal også ha en takk for faglige innspill.

Kjetil Korsnes i BioVivo Technologies AS skal ha en stor takk for utførsel av RT qPCR analysene, samt hjelp til tolkning av data. Takk til førsteamanuensis II Tom Ole Nilsen ved Universitetet i Bergen for utførsel av og opplæring på NKA-enzymaktivitetsanalyser. Jeg vil også takke Solfrid Henriksen, Fredrikke Nyberg og Nimalan Nadanasabesan for hjelp ved prøveuttak.

Prøvematerialet er tatt av fisk fra settefiskanlegget til Marine Harvest Norway i Glomfjord i Nordland fylke. Jeg skylder dem derfor en stor takk for delfinansiering og tilrettelegging i forbindelse med prøveuttak, da spesielt driftsleder Svante Brun. Sistnevnte skal også ha takk for å tålmodig ha svart på utallige mailer med spørsmål angående produksjonen.

Jeg vil takke min kjære Anne for all tålmodighet og støtte gjennom årene med studier. Våre to små solstråler, Amanda og Maja, har kommet til underveis. Takk for at dere har gitt pappa andre ting å tenke på en laks.

Bodø 14.05.2018

Carl Ruben Ærø

Innhold

Sammendrag	II
Summary	III
Forord	IV
1. Innledning	1
1.1 Livssyklus hos Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i>)	1
1.2 Smoltifisering hos Atlantisk Laks	2
1.2.1 Morfologiske endringer	2
1.2.2 Atferdsmessige endringer	2
1.2.3 Fysiologiske endringer	3
1.2.4 Hormonelle endringer	7
1.2.5 Temperaturens påvirkning på smoltifisering	8
1.2.6 Fotoperiodens påvirkning på smoltifisering	9
1.3 Kommersiell smoltproduksjon	12
1.3.1 Svinn i kommersielt lakseoppdrett	14
1.4 Hvordan dokumenteres smoltifisering i kommersielt lakseoppdrett?	15
1.5 Smolt i lovverket	16
1.6 Bruk av lys - fra naturlig fotoperiode til kontinuerlig belysning	17
1.7 Domestiseringseffekt	18
1.8 Hypotese og problemstillinger	19
2. Materiale og metode	20
2.1 Fisk og produksjonssyklus	20
2.2 Prøvetaking	22
2.4 Vekst	23
2.3 Analyser av blod	23
2.3.1 Plasmaklorid	23

2.3.2 Plasmaosmolalitet.....	24
2.3.3 Plasmamagnesium	24
2.5 Analyse av Na^+ , K^+ -ATPase enzymaktivitet i gjelle.....	24
2.6 Analyser av Na^+ , K^+ -ATPase mRNA-uttrykk.....	26
2.6.1 Ekstraksjon av RNA fra gjellevev	28
2.6.2 RT qPCR	28
2.6.3 Behandling av data	30
2.7 Morfologiske trekk.....	32
2.8 Statistikk.....	32
3. Resultat.....	33
3.1 Vekst.....	33
3.2 Plasmaklorid.....	35
3.3 Plasmaosmolalitet.....	35
3.4 Plasmamagnesium	36
3.5 Gjelle Na^+ , K^+ -ATPase enzymaktivitet.....	37
3.6 Gjelle Na^+ , K^+ -ATPase mRNA-uttrykk	38
3.7 Morfologiske smoltifiseringstrekk	39
3.8 Sjøvannstester.....	41
3.8.1 Plasmaklorid.....	41
3.8.2 Plasmaosmolalitet.....	42
3.8.3 Plasmamagnesium	43
3.9 Dødelighet etter sjøutsett.....	44
4. Diskusjon.....	45
4.1 Hovedfunn.....	46
4.2 Vekst.....	46
4.3 Plasmaklorid.....	48
4.4 Plasmaosmolalitet.....	49

4.5 Plasmamagnesium	50
4.6 Gjelle NKA-enzymaktivitet	51
4.7 Gjelle NKA mRNA-uttrykk	53
4.8 Morfologiske smolt-karakterer	56
4.9 Sjøvannstester.....	57
4.9.1 Plasmaklorid.....	57
4.9.2 Plasmaosmolalitet.....	60
4.9.3 Plasmamagnesium	61
4.10 Domestiseringseffekt.....	61
4.11 Dødelighet etter sjøutsett.....	62
5. Konklusjoner	64
Litteraturliste	66

2 vedlegg

1. Innledning

Innenfor klassen Beinfisker (*Teleostei*) finnes blant annet familien Laksefisker (*Salmonidae*). Denne består av 11 ulike slekter, hvorav slekten *Salmo* er en av dem. I flere av disse slektene er anadrom livsstrategi vanlig, som for eksempel *Oncorhynchus* – slekten (Stillehavslaks), *Salmo*-slekten og *Salvelinus*-slekten (Røyeslekten). Begrepet anadrom innebærer en livsstrategi hvor individet foretar en vandring fra ferskvann til saltvann og deretter returnerer til ferskvann for å reproducere (Thorstad. et al., 2011).

1.1 Livssyklus hos Atlantisk laks (*Salmo salar*)

Innenfor slekten *Salmo* finner man arten Atlantisk laks (*Salmo salar*). Denne arten består i hovedsak av populasjoner med individer som er anadrome (Thorstad. et al., 2011). Atlantisk laks gyter i ferskvann fra september til februar, hovedsakelig i elver. Sørlige populasjoner gyter senere enn populasjoner lenger nord, da eggutvikling tar lengere tid ved lavere vanntemperaturer. Dette henger sammen med at klekketidspunktet på våren er viktig for yngeloverlevelse. Ved gyting på høsten graver hunnlaksen gytegrøp i grusen hvor eggene legges. Hannlaksen befukter eggene med melke før de tildekkes med grus. De befruktede eggene klekkes våren etter, og ynglene lever av næring fra plommesekken de første 5-6 ukene. Etter hvert blir føden planktondriv, insektslarver og insekter. Utseendemessig får den mørke «fingermerker» på sidene samt mindre sorte og røde prikker. På dette livsstadiet kalles laksen parr (Pethon & Nyström, 2005). Varigheten på dette livsstadiet varierer mellom 1-8 år ut ifra breddegrad, genetikk og andre miljømessige faktorer (Thorstad. et al., 2011) mens 2-6 år er vanligst (Klemetsen et al., 2003). Før parren vandrer til saltvann gjennomgår den en parr-smolt transformasjon, også kalt smoltifisering. Den blir da en smolt (McCormick, 2013). Når den forlater ferskvann som smolt er den 10-20 cm lang og veier 10g-80g. Etter 1-5 år med næringsinntak og vekst i havet, vender den tilbake til ferskvann som kjønnsmoden laks for å gyte (Thorstad. et al., 2011). En laks som har vært en vinter i sjøen (ensjøvinter) veier 1-3 kg når den kommer tilbake til elva (Otero et al., 2011). Fangstatistikk fra norske lakseelver antyder at over 50 prosent av laksen i norske elver er ensjøvinters laks (SSB, 2018).

1.2 Smoltifisering hos Atlantisk Laks

Smoltifisering er en morfologisk, atferdsmessig og fysiologisk forandring parren gjennomgår i ferskvann, med den hensikt å forberede seg på et opphold i saltvann. Overgangen til det marine miljø fører til flere ulike utfordringer for smolten. Økt predator-press i havet, stor endring i salinitet, lange svømmedistanser samt annen diett er noen eksempler på faktorer som krever tilpasning hos smolten. Endring i fotoperiode (varighet av dagslys) er den viktigste utløsende faktoren for smoltifisering. Vanntemperatur påvirker hastigheten på prosessen (Thorstad. et al., 2011).

1.2.1 Morfologiske endringer

Parren mister sine karakteristiske mørke «fingermerker» og røde og svarte prikker. Den får mørkere rygg, mørke finner, blanke sider og lys buk. Dette gjør den mer tilpasset en pelagisk tilværelse i havet. Kroppsfasongen blir slankere, og forholdet mellom lengde og vekt reduseres (kondisjonsfaktor). Dette kan sees i sammenheng med det økte energibehovet smoltifiseringsprosessen fører med seg, med nedbryting av fettvev og økt lengdevekst. En lengre og slankere kropp kan også føre til bedre svømmeferdigheter, noe som er en fordel da predatortrykket er høyere i havet (Figur 1) (Hoar, 1988; McCormick, 2013; Thorstad. et al., 2011).



Figur 1: Morfologiske forskjeller mellom parr (øverst) og smolt (nederst).
Begge foto: Carl Ruben Ærø

1.2.2 Atferdsmessige endringer

I ferskvann er parren territoriell og stasjonær, og kan opptre aggressivt mot artsfrender. Den svømmer motstrøms (positiv reotaksis), er næringsøkende og oppholder seg for det meste nært bunnen. Under smoltifiseringsprosessen forsvinner den territorielle og stasjonære atferden, og smolten forlater bunnen. Den får en mer vilkårlig orientering i forhold til strømmen og lar seg

føre nedstrøms mot havet. Økt preferanse for høyere salinitet samt stim-atferd er vanlig (Heggberget et al., 1992; McCormick, 2013; Webb, 2007).

1.2.3 Fysiologiske endringer

En endring fra ferskvannsomgivelser til marine omgivelser stiller en rekke fysiologiske krav for at smolten skal overleve. Den store endringen i salinitet er en av de miljømessige utfordringene fisken må takle (McCormick, 2013)

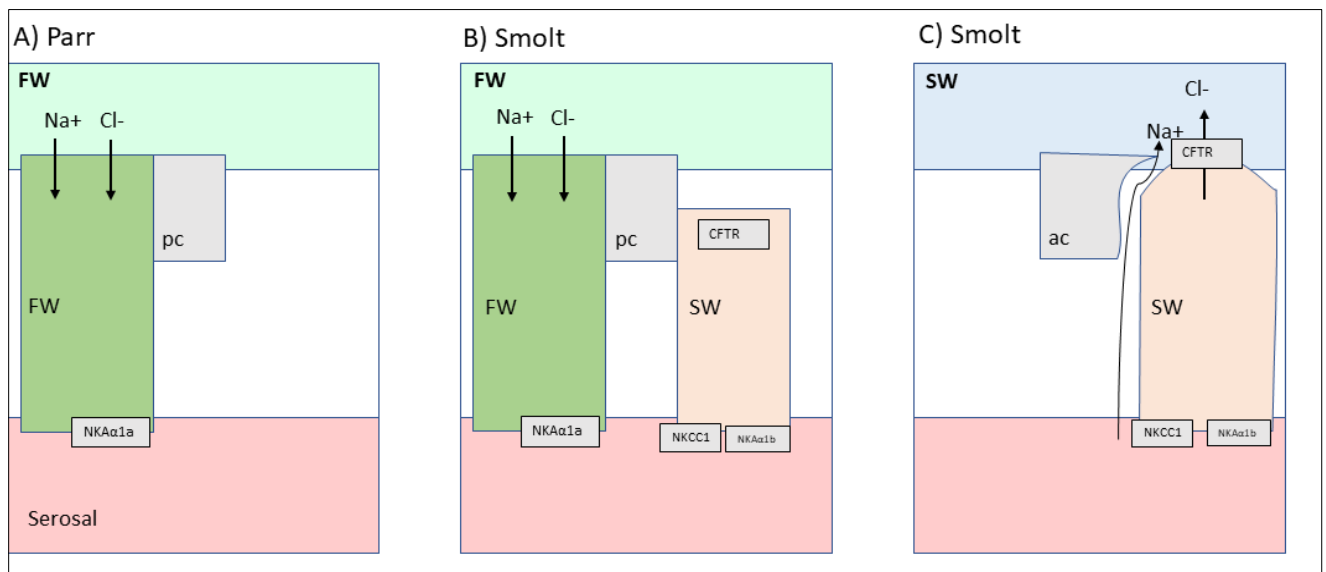
Kroppsvæsken til fisk inneholder ioner og et visst antall oppløste partikler og kan deles i to grupper; væsken på innsiden av cellene (Intracellulærvæsken, ICF) og væsken på utsiden av cellene (ekstracellulærvæsken, ECF). Intracellulærvæsken utgjør 40 % av kroppsvolumet. Eksempler på ekstracellulære kroppsvæsker hos fisk er blodplasma, lymfevæske og intestinalvæske (Heggberget et al., 1992).

Antall løste molekyler eller ioner i en væske er definisjonen på osmolalitet (osmotisk trykk). I ferskvann hvor laksefisk finnes er osmolaliteten 0 - 10 mOsm kg⁻¹ (milliosmol per kg vann). I saltvann er den 1000 mOsm kg⁻¹. Beinfisk har en osmolalitet i den ekstracellulære kroppsvæsken på 260-360 mOsm kg⁻¹. Denne er uavhengig av osmolaliteten i vannmiljøet rundt og må derfor reguleres. Saliniteten i ferskvann og saltvann er henholdsvis 0 og 32-35 ‰. Fisken er altså hyper-osmotisk i ferskvann (lavere osmotisk trykk i miljøet rundt), mens den er hypo-osmotisk i saltvann (høyere osmotisk trykk i miljøet rundt). I ferskvann taper fisken kontinuerlig ioner til omgivelsene, samt at vann trenger inn på grunn av høyere osmotisk trykk i fisken. Den må derfor aktivt ta opp ioner fra vannet rundt, samt skille ut vann. I saltvann taper fisken vann til miljøet rundt, samt at ioner diffunderer inn i fiskekroppen. Fisken må da aktivt skille ut ioner, samt drikke vann. For at fisken skal klare å opprettholde vann- og saltbalanse i kroppen både i ferskvann og saltvann, er det ulike organer som tar opp eller skiller ut vann og ioner. Dette kalles osmoregulering (McCormick, 2013; Stefansson et al., 2008)

GJELLER

Gjellene er i tillegg til gassutveksling, viktig for pH-regulering i kroppsvæske og utskillelse av ammoniakk og ammonium fra proteinnedbrytning. I ferskvann tas ioner opp over gjellene, mens i saltvann utskilles ioner her. Transport av ioner (Na⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, H⁺) over fiskens gjeller utføres i hovedsak av spesialiserte mitokondrierike kloridceller lokalisert på gjellefilamentene og gjellelamellene (Evans et al., 2005). Det er påvist tre ulike transportproteiner i disse kloridcellene. Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC) og cystic fibrosis

transmembrane regulator (CFTR) (Figur 2) (McCormick, 2013). NKA er et enzym som finnes i alle celler hos dyr. I kloridcellen, hvor det er høyere konsentrasjoner av dette enzymet, er NKA lokalisert i den basolaterale membranen. NKA-enzymet har flere underenheter, deriblant $\text{NKA}\alpha$, $\text{NKA}\beta$ og $\text{NKA}\gamma$ (Nilsen et al., 2007). I kloridcellene på gjellene til Atlantisk Laks er det påvist to isoformer av den katalytiske underenheten $\text{NKA}\alpha$; ferskvannsisoformen $\text{NKA}\alpha 1a$ og saltvannsisoformen $\text{NKA}\alpha 1b$ (McCormick et al., 2009). Utbredelsen av $\text{NKA}\alpha 1a$ i gjellene til Atlantisk laks har vist seg å avta ved smoltifisering, mens mengden $\text{NKA}\alpha 1b$ øker (Nilsen et al., 2007)(Figur 2).



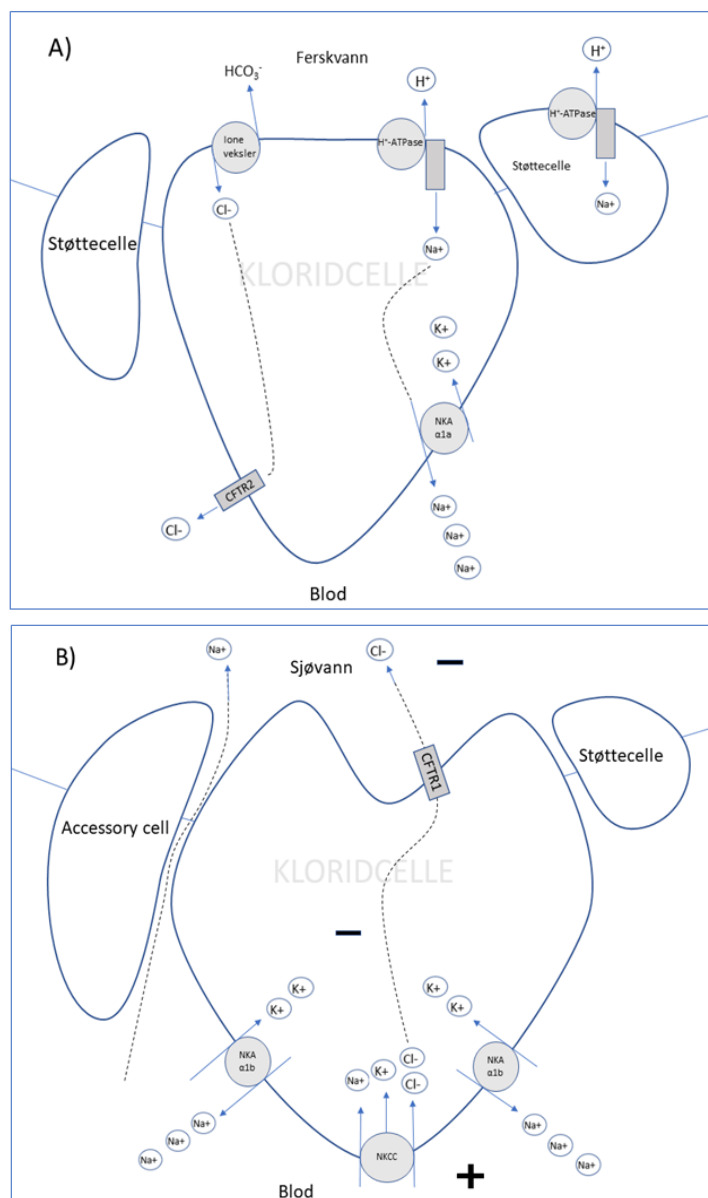
Figur 2: Skjematiske framstillinger av endringer i $\text{NKA}\alpha 1a$ - og $\text{NKA}\alpha 1b$ kloridceller i gjellevev under smoltifisering. Hos parr i ferskvann (FW) (A) dominerer kloridceller med $\text{NKA}\alpha 1a$. Under smoltutvikling øker andelen kloridceller med $\text{NKA}\alpha 1b$ enzymer. Disse cellene ligger i gjellevevet skjult bak støttecellene, slik at de ikke er i kontakt med vannet og er dermed inaktive. Etter eksponering for saltvann (SW) (C), vokser $\text{NKA}\alpha 1b$ - kloridcellene slik at de får kontakt med det eksterne vannmiljøet rundt og kan begynne å pumpe ut ioner. Kloridceller med $\text{NKA}\alpha 1a$ forsvinner. NKCC1 og CFTR øker i omfang under smoltifisering (B), og fortsetter å øke etter eksponering for saltvann (C). NKA: Na^+/K^+ -ATPase, NKCC1 : $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter, CFTR : cystic fibrosis transmembrane regulator, ac: asseccory cell, pc: pavement cell (støttecelle). Figur tegnet etter McCormick (2013).

I ferskvann byttes Cl^- fra vannet med HCO_3^- ved en ioneveksler på den apikale (toppen) overflaten av kloridcellen. HCO_3^- og H^+ dannes når CO_2 fra respirasjon reagerer med vann i fiskekroppen. Cl^- forlater kloridcellen gjennom CFTR (ione kanal) over til blodet over en nedadgående elektrisk gradient. Blodet er positivt ladd i forhold til kloridcelle. Na^+ kommer inn i cellen fra vannet ved utveksling mot H^+ , i både kloridcelle og støttecelle, gjennom H^+ ATPase kanal (ione kanal) lokalisert i apikal-overflaten. Na^+ går til blod ved NKA (Figur 3A). I sjøvann skaper NKA en intracellulær svak elektronegativ gradient ved utskillelse av 3 Na^+ og opptak av 2 K^+ fra blod. Kloridcellen blir negativ ladet (-100 millivolt), mens blodet positivt ladet. NKCC utnytter denne negative gradienten til å transportere Cl^- inn i kloridcelle

fra blod. Cl^- fraktes videre ut gjennom CFTR til vannet ved den nedadgående elektriske gradienten (sjøvannet er også negativt ladd, bare i mindre grad enn kloridcelle). Fjerningen av Cl^- fra blod fører til en elektrokjemisk ubalanse som driver Na^+ ut av blod til vannet ved paracellulære kanaler (Figur 3B)(McCormick, 2001; Stefansson et al., 2008).

Det er påvist to isoformer av NKCC i vertebrater (virveldyr). NKCC1 er mest utbredt i ione-utskillende kloridceller, og har vist seg å øke i omfang ved smoltifisering hos Atlantisk laks (Nilsen et al., 2007; Stefansson et al., 2008). NKCC2 er den ione-absorberende isoformen (McCormick, 2013). CFTR er en apikal lokaliserert kanal som Cl^- forlater kloridcellen gjennom. CFTR 1 øker i omfang under smoltifisering mens CFTR 2 ikke endres. Det er antatt at CFTR 1 isoformen er utskiller-versjonen (Nilsen et al., 2007).

Figur 3: Forenklet figur som viser ionetransport i og ved kloridceller på gjellevev til laksefisk i ferskvann (A) og sjøvann (B). I ferskvann byttes Cl^- fra vannet mot HCO_3^- ved en ioneveksler. HCO_3^- og H^+ dannes når respiratorisk CO_2 reagerer med vann. Cl^- går til blodet via CFTR ione kanal over en nedadgående elektrisk gradient. Na^+ byttes mot H^+ ved H^+ -ATPase ione kanal, og går til blod ved $\text{NKA}\alpha 1a$. Na^+ byttes også ved H^+ -ATPase ione kanal i støttecelle. I sjøvann skaper $\text{NKA}\alpha 1b$ en negativ ladning i kloridcelle ved utskillelse av 3 Na^+ og inntak av 2 K^+ . Dette utnyttes av NKCC til å ta inn 2 Cl^- . Fjerning av Cl^- fra blod fører til en elektrokjemisk ubalanse. Blodet blir positivt ladd. Dette driver Na^+ ut til vannet via paracellulære kanaler. Cl^- forlater cellen gjennom CFTR over en nedadgående elektrisk gradient. Sjøvannet (0 millivolt) er mindre negativt ladd enn kloridcelle (-100 millivolt). Cl^- : Kloridion, Na^+ : Natriumion, K^+ : Kaliumion, H^+ : Hydrogenion, HCO_3^- : Bikarbonation, CFTR: Cystic fibrosis transmembrane regulator, NKA: Na^+ - K^+ -ATPase. NKCC: Na^+ - K^+ -2 Cl^- -cotransporter. Tegnet etter McCormick (2001).



GASTROINTESTINALE TRAKT

Munn, gjellehule, spiserør, magesekk, blindsekker, midttarm og baktarm er det som omfattes av den gastrointestinale trakt. I saltvann drikker smolten vann for å kompensere for det osmotiske vanntapet. Mengden NKA og NKCC2 øker i tarmen gjennom smoltifiseringen. Dette er for å absorbere ioner fra vannet i tarmen og over i blodet. Na^+ og Cl^- tas opp i spiserør magesekk og noe i tarmen, fraktes via blodbane og skilles ut over gjellene. Det osmotiske trykket i tarmvæsken reduseres ytterligere ved utfelling av Mg^{2+} og Ca^{2+} baktarmen som karbonater. Økt bikarbonat (HCO_3^-) transport fra blod til tarm er observert ved smoltifisering, og dette fasiliteter karbonatutfelling ($\text{Ca/MgCO}_3(\text{s})$) (Grosell, 2010). Etter reduksjonen i osmotisk trykk diffunderer vann over tarmveggene, både paracellulært og transcellulært (McCormick, 2013; Sundh et al., 2014). Hos Atlantisk laks ble det observert økt væsketransport over bakre tarm under smoltifisering og etter sjøvannseksponering (Veillette et al., 1993). Vanntransportkapasitet og NKA aktivitet økte i Chinook-laks tarm i løpet av tidlig sommer rett før utvikling av sjøvanntoleranse (Veillette & Young, 2004). Sundh et al., (2014) observerte en økt genekspresjon av NKA α 1b i den distale delen av tarmen hos Atlantisk laks under smoltifisering. I samme studie så man at genuttrykket av absorpsjonsformen NKCC2 viste en økning under smoltifisering, både i den proksimale og distale del av tarmen. Hos smoltifiserende ørret (*Salmo trutta*) økte vanntransportevnen i tarmen, mens NKA aktiviteten i tarmen sank utover våren og forsommeren (Nielsen et al., 1999).

NYRER OG URINBLÆRE

Hos beinfisk i ferskvann er nyrenes hovedoppgave og skille ut store mengder vann som har kommet inn i fisken ved osmose. Dette utskilles som tynn urin gjennom urinblæra. Nyrene og urinblæra spiller også en viktig rolle i reabsorbering av ioner (Na^+ , Cl^-) når fisken oppholder seg i ferskvann. Nyrene reabsorberer også noe vann. Hos beinfisk i saltvann produserer nyrene urin som er isoosmotisk med plasma og inneholder overflødige divalente ioner (Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-}) samt fosfat (PO_4^{3-}). Disse ionene kommer fra tarmen hvor alkalisering av saltvann har foregått. Ionene fanges opp av nyrene, og skilles ut i urin. I tillegg har nyrene hos saltvannsbeinfisker en rolle i reabsorbering av vann (Edwards & Marshall, 2013; Reimers & Døving, 1992). Urinstrømmen er følgelig mye høyere hos beinfisk i ferskvann enn i saltvann.

Eddy & Talbot (1985) observerte en økt urinproduksjon utover våren hos atlantisk laks, samtidig som NKA aktiviteten i gjellene var økende.

McCormick et al., (1989) undersøkte blant annet NKA aktivitet i nyrer, og observerte tilnærmet uendrede verdier i både Atlantisk laks som sto under kontinuerlig lys og Atlantisk laks under simulert naturlig daglengde (SNP). Dette var i løpet av perioden Mars til August.

1.2.4 Hormonelle endringer

Endokrinsystemet (hormonsystemet) til fisk består av kjertler som utskiller hormoner, samt reseptorer i de fleste deler av kroppen som registrerer endringer i hormonmengde slik at en fysiologisk respons kan iverksettes. Pinealkjertelen, hypothalamus, hypofysen, nyren (interrenalceller), leveren og skjoldbruskkjertelen er endokrine organ som er essensielle i smoltifiseringsprosessen (Staurnes et al., 1992).

Hos beinfisk registreres endringer i fotoperiode av pinealkjertelen og retina. Dette er fotosensitive strukturer lokalisert i henholdsvis hjerne og øye på fisken. Informasjon om lysmengde sendes som utslipp av melatonin fra pinealkjertelen til hypothalamus. Lite lys stimulerer til mer utslipp av melatonin, mens perioder med mer lys hemmer melatoninproduksjon. Høy temperatur øker syntesen av melatonin (Falcon et al., 2010; Staurnes et al., 1992). Hypothalamus registrerer endringen i mengden melatonin, og skiller ut stimulerende hormoner som oppfattes av hypofysen. Hypofysen skiller ut prolaktin, ACTH (Adrenokortikotropt hormon), GH (vekshormon) og TSH (tyreoid stimulerende hormon). ACTH stimulerer interrenalceller i fremre del av nyre til utslipp av kortisol, som sammen med GH er viktig i stimulering av osmoreguleringsprosesser i tarm, nyre og gjeller, og dermed utvikling av sjøvannstoleranse. Ved stimuli fra TSH, slipper tyreoidkjertelen (skjoldbruskkjertelen) ut tyreoid-hormoner (trijodtyronin; T3/ tyroksin; T4) som styrer sølvfarging og atferdsendringer. Prolaktin virker hemmende på effekten av GH samtidig som den er stimulerende på dannelsen av ferskvannskloridceller. Det er derfor ansett som en hemmer av smoltifiseringsprosessen. GH har vist seg å være det første hormonet som øker ved endring i fotoperiode og er sammen med kortisol det som stimulerer til lengdeveksten som fører til redusert k-faktor under smoltifisering. Det har vist seg at parr av atlantisk laks har lave nivåer av GH på våren, mens nivåene økte markant i smolt. GH stimulerer leveren til utskillelse av IGF-1 (Insulin-liknende veksfaktor 1) som er viktig for vekst og metabolisme (McCormick, 2013)

Smoltifiseringsprosessen er de fysiologiske responser som følge av den overnevnte hormonkaskaden. For at prosessen skal igangsettes, må de rette ytre miljøforhold være tilstede (McCormick, 2013; Staurnes et al., 1992)

1.2.5 Temperaturen påvirkning på smoltifisering

Temperatur er en svært viktig faktor for vekst og utvikling hos laks. Økt temperatur fører til høyere metabolisme(stoffskifte) og stimulerer derfor veksten (Rosten & Fjellheim, 2010). Den årlige temperatursyklusen fisken går igjennom, definerer vekstpotensialet for fisken og dermed også alderen for når fisken rekker minimumsstørrelse for smoltifisering (Stefansson et al., 2008).

For atlantisk laks i vill tilstand har det vært vanlig å operere med terskeltemperatur for når smolten vandrer til sjøvann (Stefansson et al., 2008). Utvandringen for smolt av Atlantisk laks vil normalt skje ved stigende temperatur rundt 10 °C. Dette kan variere (Staurnes et al., 1992). Zydlewski et al.(2005) indikerte etter et laboratorieforsøk at døgngader var et bedre mål enn temperaturterskel for når utvandringen skjer. I dette studiet ble 508 døgngader oppgitt som det atferdsmessige smoltvinduet. Dette står i kontrast til hva som er observert hos Atlantisk laks i to norske elver ; 426 D° og 328 D° (Urke et al., 2014).

Temperatur er ansett som en hastighetskontrollerende faktor i smoltifiseringen, hvor blant annet hastigheten på responsen fra endring i fotoperiode påvirkes av temperatur (Staurnes et al., 1992). McCormick (1997) konkluderte med at temperatur og endringer i fotoperiode virket sammen i å øke hastigheten på smoltifiseringsprosessen. Det er hevdet at temperatur alene uten endringer i fotoperiode ikke kan stimulere til fullstendig smoltifisering (McCormick et al., 2002). Økt temperatur opp til en viss grense (15 °C) har vist seg å gi tidligere smoltutvikling for Atlantisk laks og steelhead (anadrom regnbueørret; *Oncorhynchus mykiss*). Temperatur over dette hemmet smoltutvikling (McCormick, 2013). Chinook-laks holdt på temperaturer over 17 °C viste redusert evne til å smoltifisere, observert ved redusert økning i NKA-enzymaktivitet (Marine & Cech Jr, 2004). Handeland et al. (2004) undersøkte utvikling av sjøvannstoleranse hos to stammer Atlantisk laks holdt i 12 °C, 8,9 °C og omgivelsestemperatur (2,4 – 11,9 °C). NKA-aktivitet over gjeller økte tidligst for gruppen på den høyeste temperaturen (12 °C) og toppet seg ca. en måned før gruppen på 8,9 °C.

Perioden hvor smolten innehar de fysiologiske egenskapene for å klare seg i sjøvann, kalles det fysiologiske smoltvinduet (heretter smoltvindu). Høye temperaturer framskynder smoltifiseringen, men kan også korte ned smoltvinduet hvis fisken holdes på ferskvann. Den kan da miste smoltegenskaper som for eksempel sjøvannstoleranse og morfologiske trekk. Denne prosessen kalles desmoltifisering. Begrepet bør brukes med forsiktighet da det ikke innebærer fullstendig tap av smoltegenskaper (McCormick, 2013).

I Handeland et al., (2004) sitt studie hadde smolten en varighet av høy NKA-enzymaktivitet (>90% av maksimum) på 250 døgngader, noe som ble estimert til å være smoltvinduet. 500 døgngader etter det kalkulerte toppnivået var NKA-enzymaktivitetsnivåene nede på pre-smolt nivå. Andre studier har også oppgitt varighet på smoltvindu. Stefansson et al., (1998) oppga en periode på god smoltstatus, målt med NKA-enzymaktivitet, til å være 280 og 350 døgngader ved henholdsvis 12 og 10 °C. Ved 14 °C vedvarte statusen i 450 døgngader.

Ulike stammer av atlantisk laks kan være tilpasset ulike temperaturer (Handeland et al., 2004). Sett under ett vil ekstremt lave eller høye temperaturer forsinke, eller i verste fall hemme smoltifiseringsprosessen, og det er vanskelig å definere et optimalt antall døgngader eller eksakt temperaturgrense for en komplett smoltifisering (Stefansson et al., 2008).

1.2.6 Fotoperiodens påvirkning på smoltifisering

For laksefisker er endringen i forholdet mellom dag- og natlengde (fotoperiode) den viktigste miljømessige faktoren for synkronisering av smoltifisering (Hoar, 1988; McCormick, 2013; Staurnes et al., 1992). Endringen i fotoperiode registreres av retina og pinealkjertelen, som viderefører signalet ved å slippe ut mørkestimulert/lysinhibert melatonin eller ved nevralt informasjon. Dette oppfattes av hypothalamus som igangsetter en hormonell kjedereaksjon (Falcon et al., 2010; Staurnes et al., 1992).

Fotoperiode påvirker gjennom endokrinsystemet blant annet vekst, atferd (Oppedal et al., 2001), fettmetabolisme (Nordgarden et al., 2003b), appetitt (Nordgarden et al., 2003a), gonadeutvikling (Taranger et al., 1998), utslipp av veksthormon og IGF-1 utslipp (Nordgarden et al., 2005) hos atlantisk laks.

Veksthastighet, hypoosmotisk reguleringskapasitet og migrasjonstendens er smoltifiseringsrelaterte prosesser som lettest lar seg påvirke av manipulerede endringer i fotoperiode, mens morfologiske trekk som sølvfarging lar seg minst påvirke (Heggberget et al., 1992).

Ved å eksponere parr av atlantisk laks for en fotoperiode på 12 timer lys (12L:12M) i 6 uker observerte Huang et al., (2010) gradvis økende verdier av melatonin i blodplasma i den mørke perioden i forhold til den lyse perioden av døgnet. Ved eksponering for kontinuerlig lys (24L:0M) påfølgende 6 uker holdt melatoninnivåene seg på et stabilt lavt nivå gjennom døgnet. I slutten av perioden med kontinuerlig lys hadde fisken utviklet sølvfarget skinn, samt NKA-enzymaktivitetsverdi med snittverdi som tilsa sjøvannstoleranse. Kondisjonsfaktor gikk signifikant ned samme periode.

Studier gjort på atlantisk laks har vist at smoltifiseringsprosessen kan framskyndes flere måneder (faseforskyves) ved å simulere overgang fra «vinterperiode» (kort dag) til «sommerperiode» (lang dag) på et tidligere tidspunkt enn den naturlige våren (Duston & Saunders, 1995). Den naturlige endringen i fotoperiode går gradvis, mens manipulerede fotoperioder kan bestå av konstant kort dag som skifter over til konstant lang dag eller kontinuerlig belysning. Det har vist seg at dette gir en normal smoltifisering. Bakgrunnsbelysning om natten kan føre til ufullstendig smoltifisering (Heggberget et al., 1992).

McCormick et al.(1995) undersøkte smoltifisering hos Atlantisk laks utsatt for fire ulike fotoperiode-regimer i perioden januar til mai; naturlig daglengde, brå overgang til økt daglengde i februar (15L:9M) eller mars, og kort daglengde (9L:15M). Fisken utsatt for brå overgang til økt daglengde viste en tidligere økning i nivåer av veksthormon samt NKA enzymaktivitet enn fisken utsatt for naturlig eller kort daglengde. Kondisjonsfaktoren gikk tidligere ned for fisken utsatt for brå overgang til økt daglengde sammenliknet med de andre gruppene. For gruppen utsatt for kort daglengde var økningen i veksthormon og NKA enzymaktivitet ikke like stor sammenliknet med de andre gruppene. Den kom også på et senere tidspunkt i forhold til resten av gruppene. Resultatene indikerte at veksthormon responderte på økt daglengde, samt at økningen av NKA-enzymaktivitet hadde sammenheng med de økte veksthormonnivåene.

Johnsen et al. (2000) studerte effekten av manipulert fotoperiode på sjøvannstoleranse hos laksefisken røye (*Salvelinus alpinus*). Fisken ble utsatt for 5,5 uker med kort dag (4L:20M), før de ble delt i tre grupper med følgende fotoperiode regimer: kontinuerlig lys (24L:0M), simulert naturlig fotoperiode (69° nord) eller fortsettelse av samme regime (LD 4L:20M). Gruppen utsatt for kontinuerlig lys utviklet sjøvannstoleranse 6 uker tidligere enn fisken utsatt for simulert naturlig fotoperiode, målt ved plasmaklorid- og plasmaosmolalitetsnivåer. Nivåene for NKA enzymaktivitet sammenfalt med utviklingen av sjøvannstoleranse for gruppen på kontinuerlig lys og simulert naturlig fotoperiode. Gruppen med 4 timer lys viste ingen signifikant økning i NKA-enzymaktivitet i løpet av forsøket, men utviklet sjøvannstoleranse 6 uker etter gruppen på simulert naturlig fotoperiode basert på verdier av plasmaklorid og plasmaosmolalitet. Resultatet indikerte at sjøvannstoleranse hos arktisk røye er styrt av indre sirkulære «timingmekanismer» som kan utløses av manipulerede, forlengede daglengder om våren (Johnsen et al., 2000)

Hos atlantisk laks har kontinuerlig lys helt fra klekking virket hemmende på endringer relatert til smoltifisering. Dette var unntatt sølvfarging. Eksponering for en døgnrytme med kort daglengde viste seg å oppheve denne hemmende effekten. Dette indikerer at et «vintersignal» (kort dag) er nødvendig for at de indre smoltifiseringsrytmene skal iverksettes og respondere på økt daglengde (Heggberget et al., 1992).

Handeland et al., (2013a) studerte langtidseffekter av ulike temperaturer og fotoperioderegimer på vekst, NKA enzymaktivitet, sjøvannstoleranse og veksthormon hos pre-smolt av atlantisk laks. Eksperimentet startet 10 juni og sluttet 5 mai året etter. Fisken ble utsatt for kontinuerlig lys eller simulert naturlig fotoperiode på 8 °C eller 13 °C. I løpet av eksperimentet var det fisken som ble utsatt for kontinuerlig lys (24L:0M) samt høyeste temperatur (13 °C) som vokste mest. Gjelle NKA-enzymaktivitet toppet seg for gruppene på kontinuerlig lys (13 °C, 8 °C) 5 - 6 måneder før den naturlige smoltifiseringsperioden. Kloridnivåer i blodplasma målt etter 96 timer i 34,5 ‰ sjøvann viste sjøvannstoleranse for gruppene på kontinuerlig lys (13 °C, 8 °C) og gruppen på simulert naturlig fotoperiode (13 °C) i september og oktober (sammenfalt med NKA enzymaktivitets topp), mens gruppen på simulert naturlig fotoperiode og 8 °C regulerte kloridnivået ned til samme nivå i mars året etter. Undersøkelsen illustrerer faseforskyvning av smoltifiseringen ved å manipulere fotoperioden, samt temperaturen som en hastighetskontrollerende faktor på smoltifiseringsprosessen.

Ung atlantisk laks utsatt for kontinuerlig lys fra startfôring, viste ingen smolt-relatert reduksjon i k-faktor i løpet av våren (Stefansson et al., 2007). I samme undersøkelse ble det observert reduksjon i gjelle mRNA-uttrykk av NKA α 1a for fisk utsatt for simulert naturlig fotoperiode, mens gruppen på kontinuerlig lys viste ingen endring på dette. Gjelle mRNA NKA α 1b økte betraktelig for fisken på naturlig fotoperiode, mens det forble uendret hos gruppen på kontinuerlig lys. Konklusjonen var at kontinuerlig lys hindret en komplett smoltifisering ved å hemme økning i genekspresjon, utbredelse og aktivitet av gjellenes ionepumper (Stefansson et al., 2007).

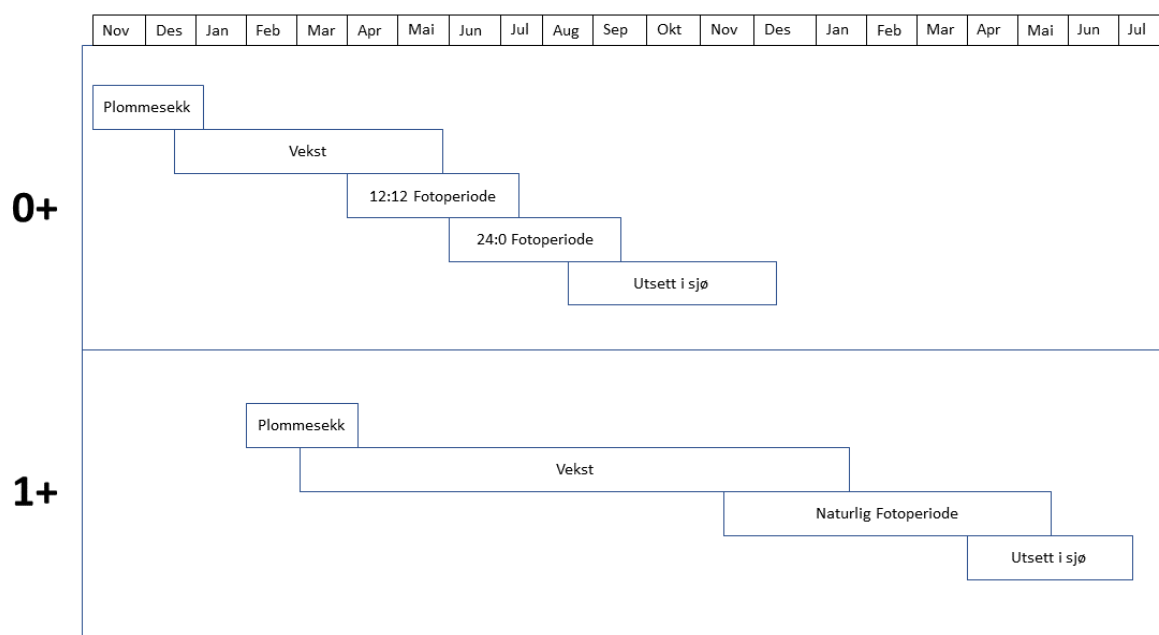
Lysintensiteten har vist seg å være utslagsgivende for vekstrate, finneutvikling, sølvfarging og skjellettutvikling under smoltifisering hos atlantisk laks. Ved lave lysintensiteter (<43 lux) var andelen deformiteter i skjelettet høyest. Mindre sølvfarging og finneslitasje var mest utbredt ved lave lysintensiteter, mens vekstrate var positivt korrelert med lysintensitet. Konklusjonen var at lysintensiteter over 43 lux burde brukes (Handeland et al., 2013b).

1.3 Kommersiell smoltproduksjon

Kommersiell produksjon av smolt foregår i kar på land. Produksjonsforløpet slik det foregår idag kan grovt deles i to hovedkategorier: produksjon av 0+ smolt (null-åring, høstsmolt) og produksjon av 1+ smolt (ett-åring, vårsmolt) (Stefansson et al., 2005).

Da oppdrett av Atlantisk laks startet opp, ble det produsert 2+ smolt. Dette var laks som smoltifiserte våren 2 år etter klekking. Utvikling av bedre fôr samt bruk av varmere vann gjorde det mulig å produsere 1+ smolt. Produksjonssyklusen for 1+ smolt tar utgangspunkt i det naturlige smoltifiseringsforløpet, derav navnet vårsmolt. Rognen legges i klekkeriene i februar/mars på kaldt vann. Yngelen blir til parr på våren/sommeren og vaksineres i løpet av vinteren. Smoltifiseringsprosessen skjer på våren et år etter klekking under en naturlig fotoperiode og fisken settes deretter i sjøen (Figur 4) (Stefansson et al., 2005).

På slutten av 80-tallet begynte produksjon av laksesmolt som ble sjøsatt samme år som den ble klekket (0+). Rognen legges på klekkeri i desember/januar i opptil 8 °C varmt vann. Vanntemperaturen økes ytterligere for yngelen, da dette gir økt vekst. De to mest brukte måtene å lysmanipulere parr inn mot smoltifisering er «firkantregimet» eller «simulert vårregime». Ved førstnevnte settes fotoperioden til 12 timer mørke og 12 timer lys (12L:12M) når parren er stor nok (>20 g). Dette er et simulert vintersignal. Denne perioden varer i vanligvis 6 uker, men kan variere mellom 4 og 12 uker. Etter dette settes fotoperioden til 24 timer lys (24L:0M). Dette er et simulert vårsignal, og varer i 3-8 uker. Parren smoltifiserer i løpet av «vårsignalet». Fisken settes så i sjøen på høsten. Ved «Simulert vårregime» settes fisken på 12L:12M fotoperiode hvor mengden lys per dag gradvis økes til man oppnår 24:0 fotoperiode. Parren smoltifiserer i løpet av den simulerte våren og settes i sjøen når den er klar, dette blir på høsten (figur 4) (Stefansson et al., 2005).



Figur 4: Figuren illustrerer produksjonsforløpet for 0+smolt og 1+smolt. Tegnet etter Stefansson (2005).

Produksjon av 0+ smolt fører til kortere oppholdstid i settefiskanlegget samt en tidligere start på vekstperioden i sjøen enn det som er vanlig ved produksjon av 1+ smolt.

En produksjonstrategi som innebærer både 0+ og 1+ smolt gjør at smoltprodusenten kan sette fisk i sjøen to eller flere ganger i året. Dette gir markedet mer stabil tilgang på laks av slakteklar størrelse, samt mer effektiv bruk av produksjonsfasiliteter ved settefiskanlegget (Lysfjord et al., 2004). Generelt viser dødelighetsdata at 0+smolt har like god eller bedre overlevelse etter 15 måneder i sjø (Svåsand et al., 2016).

Produksjonsmåtene beskrevet ovenfor er typiske måter å få fram laksesmolt på. Disse kan variere mye fra anlegg til anlegg, og påvirkes ofte av forutsetninger som vanntilgang, vannkvalitet og vanntemperatur. I 2012 åpnet fiskeridirektoratet for produksjon av postsmolt opptil 1000 gram i lukkede eller semilukkede anlegg på land eller i sjø. Dette, samt situasjonen med høyt smittepress av Lakselus (*Salmonis lepeoptheirus*) på laks i åpne sjømerder, har gjort det mer vanlig med såkalt stor-smolt produksjon ved norske settefiskanlegg. Smolten holdes da i kar med brakkvann eller sjøvann til den når størrelser på inntil 1000 gram, og deretter settes i sjø (Hagspiel et al., 2018).

1.3.1 Svinn i kommersielt lakseoppdrett

Antallet produsert laksesmolt fra norske settefiskanlegg har mer enn doblet seg siden år 2000, samtidig som antallet død laks registrert i matfiskfase kan ganges med tre i samme tidsperiode (Tabell 1) (Fiskeridirektoratet, 2018). Det er ofte forhøyet dødelighet den første perioden etter sjøutsett, og denne dødeligheten representerer ofte en vesentlig del av den totale dødeligheten i matfiskfasen. Opptil 20 % av all sjøsatt fisk når ikke konsum (Tabell 1) (Hjeltnes et al., 2017).

Tabell 1: Salg av laksesmolt fra norske settefiskanlegg i 5 utvalgte år fra og med 2000 til og med 2016 samt svinn i sjø for de samme årene (Fiskeridirektoratet 2018).

År	Solgt smolt (1000 stk)	Svinn i sjø (1000stk)	Svinn i sjø (%)
2016	321 143	55961	17,4
2012	284 552	37979	13,3
2008	221 411	43 976	19,9
2004	147 959	25 713	17,4
2000	129 390	17169	13,3

Mattilsynet undersøkte tap av laksefisk i sjø høsten 2010, vår 2011 og høst 2011. Undersøkelsen omfattet om lag 80 % av all sjøsatt fisk, medregnet regnbueørret. For Sørvestlandet ble årsaken «settefiskrelatert» brukt på 2,1 % av registrert svinn, mens i Midt-Norge ble 5,75 % av svinnet gitt samme årsak. For Nord-Norge var tallet 2,9 %. I undersøkelsen var andelen regnbueørret 8,1 %, så tallene for laks anses som representative for hele landet (Bleie & Skrudland, 2014).

Ifølge veterinærinstituttet var tilbakemeldingene fra oppdretterne delt når det gjaldt smoltutsett i 2016. Enkelte meldte om dårlig smoltkvalitet, for liten fisk og variabel størrelse samt finneskader ved utsett. Usynkron smoltifisering ble også nevnt som et problem. Andre hadde lite problemer med smoltifisering og utsett (Hjeltnes et al., 2017).

Dårlig smoltkvalitet er ofte brukt som årsak ved dødelighet rett etter sjøutsett, selv om begrepet ikke konkret definerer hva som er galt med smolten. Ufullstendig smoltifisert laks er ekstra utsatt for osmotisk stress og patogener. De vokser heller ikke like godt som en fullstendig smoltifisert laks (Overrein et al., 2015). Fullstendig smoltifisering og sjøsetting på riktig tidspunkt er pekt på som suksessfaktorer for videre normal vekst og utvikling i sjø (Hjeltnes et al., 2017).

1.4 Hvordan dokumenteres smoltifisering i kommersielt lakseoppdrett?

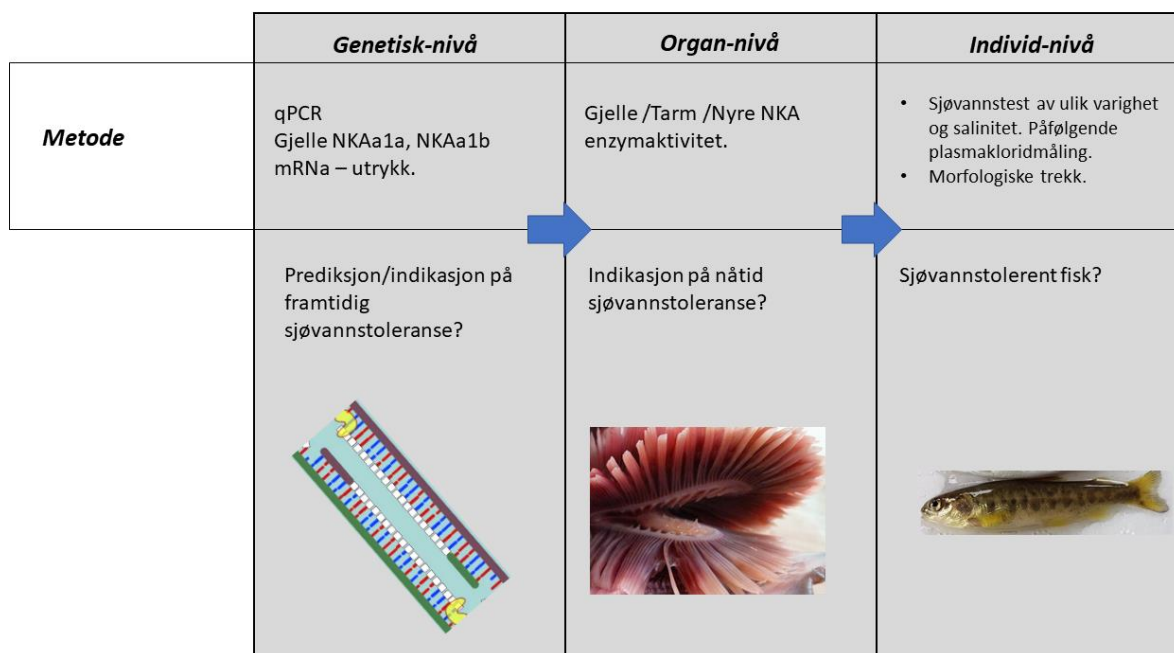
Det er utviklet ulike metoder for å avgjøre om laksen er smoltifisert. Disse metodene kan grovt deles i tre nivå basert på hva som testes i organismen (Figur 5). På genuttrykksnivå brukes PCR-metodikk (PCR: Polymerase Chain Reaction) for å måle mRNA-uttrykk av NKA α 1a og NKA α 1b i gjellelev. Målt opp og nedregulering i mRNA-uttrykket fra ferskvannsisoformen (NKA α 1a) eller saltvannsisoformen (NKA α 1b), og sammenlikning av dette opp mot tidligere prøver kan gi en indikasjon på den kommende enzymaktiviteten over gjellene (Patogen, 2018; PHARMAQanalytiq, 2018). På den måten har metoden på genuttrykksnivået en prediktiv verdi, den kan indikere framtidig sjøvannstoleranse (Figur 5). En slik metode krever lite gjellelev for å få fram pålitelige resultater, og det samme prøvemateriale kan brukes for analyse mot andre forhold, for eksempel sykdom. Man slipper dermed nye prøveuttak, og tid spares (PHARMAQanalytiq, 2018). På markedet er det flere leverandører som utfører slike analyser, blant andre Patogen AS med sin Smolt-Timer, Europharma AS med sin SmoltControl og PHARMAQ analytic AS med sin SmoltVision.

På organ-nivå måles aktiviteten av NKA-enzymet i osmoregulatoriske organer. Dette er primært i gjeller, men NKA-enzymet finnes også i tarm og nyre hos laks (McCormick, 2013). NKA-enzymaktivetsanalyse er utviklet av McCormick (1993). Metoden måler fiskens generelle aktivitetsnivå av dette enzymet på gjellene, og er mye brukt i kommersiell lakseoppdrett når smoltifiseringsgrad og utsett tidspunkt i sjø skal avgjøres (Eurofins, 2018). Resultatet sier noe om den totale NKA-enzymaktiviteten på gjellene på tidspunktet prøvene ble tatt, og det gir derfor en nåtidsindikasjon på en eventuell sjøvannstoleranse. Metoden skiller ikke på sjøvanns- eller ferskvannsisoformen (PHARMAQanalytiq, 2018), men det er en betydelig (typisk 5 dobling) forskjell i aktivitetsnivå mellom pre-smolt i ferskvann, smolt i ferskvann og post-smolt i sjøvann (Stefansson et al., 2012). Verdier over 10 μ mol ADP/mgprotein/time regnes som «smolt verdier» (MarinHelse, 2017; McCormick, 1993).

På individ-nivå brukes sjøvannstester for å observere fiskens evne til å takle sjøvann over en viss periode. Klorid og osmolalitetmålinger i blodplasma i etterkant sier noe om evnen til å skille ut ioner. 24 timer i 33-35 ‰ sjøvann er ofte brukt i norsk lakseoppdrett (Staurnes et al., 2001). Normale Cl⁻ nivåer for laksefisk i ferskvann er 115-135 mmol/l (Folmar & Dickhoff, 1980; Heggberget et al., 1992). Etter 24 timer i 33-35 ‰ sjøvann bør ikke Cl⁻ nivå i blodplasma være mer enn 5-10 mmol/l over nivået fra ferskvann. Ulempen ved en 24 timers 33-35 ‰ test er at fisk som ikke er fullstendig smoltifisert kan «hangle» seg igjennom. Her spiller størrelsen på fisken også en rolle. Hos enkelte laksefisk har sjøvannstoleransen vist seg å øke med

størrelsen. Dette er fordi kroppsvolumet øker mer ved vekst enn (gjelle)overflaten. Dermed skjer vanntapet under sjøvannseksponering saktere (Heggberget et al., 1992). En annen ulempe er at det kan også være vanskelig å vite om fisken er på tur inn eller ut av smoltvinduet. Test med varighet 96 timer ved 37,5 ‰ salinitet er også prøvd. Stor parr kan regulere ioneinnholdet i plasma på en tilstrekkelig måte i en 24 timers sjøvannstest, men disse vill ikke overleve 96 timer med høy salinitet (Staurnes et al., 2001). 40 ‰ sjøvann i 24 timer siler også ut fisk som ikke er sjøvannstolerant, men risikoen for å underestimere graden av sjøvannstoleranse foreligger ved en slik test. Dette gjenspeiler heller ikke hva som er reelle forhold i sjøen (Staurnes et al., 2001) samt at det strider mot lovverket å eksponere fisk for høyere salinitet enn 35 ‰ (FOR-2008-06-17-822).

En annen faktor som måles på individ-nivå er de morfologiske trekkene. Et eksempel på en metode som standardiserer de morfologiske trekkene er smoltindeks. Smoltindeks regnes ut med bakgrunn i sølvfarging, parrmerker og finnekanter. Hver av disse morfologiske trekkene får en verdi fra 1-4 hvor 4 er smoltverdi. De tre verdiene legges sammen og deles på tre, og smoltindeksen blir et tall mellom 1 og 4 (PHARMAQanalytiq, 2018).



Figur 5: Illustrasjon av ulike metoder å avgjøre smoltifiseringsgrad på, inndelt i tre nivå (Genetisk, Organ, og Individ-nivå).

1.5 Smolt i lovverket

Oppdrett av laks blir i hovedsak regulert av akvakulturloven av 2006 samt flere forskrifter, deriblant akvakulturdriftforskriften av 2008.

Ifølge formålsparagrafen (§ 1) til akvakulturdriftsforskriften skal det fremmes god helse hos akvakulturdyr og ivaretas god velferd hos fisk. § 26 sier at anadrom fisk skal ved utsett i sjø inneha en kondisjon og være av en slik størrelse at de kan overleve i saltvann over tid uten at dette medfører redusert velferd. I klartekst betyr dette at fisken som settes i sjøen skal være smoltifisert. Akvakulturforskriften utdyper ikke konkret hvilke tester som skal brukes for å dokumentere smoltifisering, men sier at «tilstrekkelig smoltifisering skal dokumenteres gjennom egnede tester». Det nevnes at det ikke skal brukes tester som påfører fisk vesentlige påkjenninger, og at fisk ikke skal eksponeres for vann med høyere salinitet enn 35 ‰. Ved utsett av nullårssmolt (0+) i sjø på fallende vanntemperatur, skal temperaturen være 7 °C eller høyere på utsettslokaliteten. Paragraf 63 i samme forskrift påpeker at fisk under smoltifisering ikke skal vaksineres (FOR-2008-06-17-822).

1.6 Bruk av lys - fra naturlig fotoperiode til kontinuerlig belysning

Før produksjonen av 0+ smolt startet på slutten av 80-tallet, ble det produsert 1 års eller 2 års smolt. Denne smolten ble produsert slik at smoltifiseringen ble igangsatt av den naturlige endringen i fotoperiode i løpet av våren. Fisken sto ofte i utendørskar, slik at kunstig belysning ikke var nødvendig. Ved full produksjonsyklus innendørs ble naturlig fotoperiode simulert med kunstig lys (Kittelsen et al., 1993).

Ved bruk av rogn fra lysmanipulert stamfisk, oppvarmet vann til rogn og yngel samt målrettet avlsarbeid mot vekst ble det etter hvert mulig for oppdrettere å produsere smolt som rakk den størrelsesmessige smoltifiseringsterskelen (20 g) 4-5 måneder etter klekking (0+). De første årene med 0+ smoltproduksjon gikk fisken på naturlig fotoperiode på høsten når den skulle settes i sjøen. I forhold til vårs smolt var den mørkere i skinnet. Parrmerker var ofte synlig. Dette var tydelige tegn på ufullstendig smoltifisering. For å forbedre resultatene på høstutsatt smolt (0+), ble ulike fotoperioderegimer prøvd ut. «Firkantregimet» og «simulert vår» ble tatt i bruk på første halvdel av 90-tallet. Firkantregimet ble mest brukt og er fortsatt mye i bruk (Joensen, 2016; Stefansson et al., 2005).

Bruk av kontinuerlig lys (24L:0M) gjennom hele produksjonssyklusen gjøres på noen settefiskanlegg og har blitt mer vanlig de siste årene (T. Kristensen pers.com 09.02.18, A.Fjellheim e-post 09.02.18). Dette er i enkelte tilfeller i kombinasjon med spesialfôr (SuperSmolt) som stimulerer di- og polyvalente ionereseptorer hos fisken (Nearing et al., 2002). Smoltifiseringen skjer da i løpet av 3-4 uker (Europharma, 2018). I andre tilfeller brukes

kontinuerlig lys sammen med høye vanntemperaturer og salinitet i vannet. Dette har også vist seg å gi smolt som presterer bra i sjø (Svante Brun, pers.com 13.03.17). Enkelte RAS (Resirkulerende Akvakulturstystemer) anlegg har gått over til kontinuerlig belysning (Joensen, 2016).

Hvis man oppsummerer bruk av lys i smoltproduksjon fra starten fram til i dag, ser man indikasjoner på flere skifter. Det har gått fra naturlig fotoperiode via «firkanregimet» og «simulert vår» til økende bruk av kontinuerlig belysning gjennom hele produksjonssyklusen.

1.7 Domestiseringseffekt

Å domestisere en dyreart innebærer å temme eller tilpasse dyret til menneskets miljø eller et nytt miljø (SNL, 2018). Skal man bruke denne definisjonen har norsk lakseoppdrett domestisert Atlantisk laks.

Avlsprogrammer på fisk har ofte økt vekst som mål. Hvilke mekanismer som ligger bak vekstprosessen og hvordan disse påvirkes av målrettet avl finnes det lite kunnskap om. Avlsprogram på norsk oppdrettslaks har primært fokusert på vekst og sen kjønnsmodning (Strand et al., 2007). En undersøkelse som sammenliknet vill Atlantisk laks og oppdrettet Atlantisk laks viste høyere veksthormonnivåer i oppdrettsfisk enn i vill fisk. Oppdrettslaks hadde størst vekst. IGF-1 nivåer var like mellom de to stammene (Fleming et al., 2002).

Ved å selekttere på vekst i et avlsprogram på fisk, kan egenskaper korrelert med vekst endres som et bi-produkt eller som en direkte konsekvens av seleksjonen. Eksempler på slike fysiologisk egenskaper er smoltalder og alder for kjønnsmodning (Debes & Hutchings, 2014; Gjerde, 1984).

Strand et al.,(2007) observerte en måned tidligere utviklet sjøvannstoleranse hos Atlantisk laks fra oppdrettsstamme (Aquagen) i forhold til Atlantisk laks fra villstamme. Det er også rapportert om tidlig smoltifisering i settefiskanlegg ved produksjon av større smolt (Hjeltnes et al., 2017) uten at dette er satt i sammenheng med domestiseringseffekt.

1.8 Hypotese og problemstillinger

Det er viet lite oppmerksomhet til spørsmålet om målrettet avl hos atlantisk laks kan endre tidspunkt for smoltifisering (Strand et al., 2007). Produksjon av smolt gjennom et fullstendig 24:0 lysregime har gitt fisk som presterer bra i sjø (Svante Brun, pers.com 13.03.17). Dette gir følgende hypotese:

- Smoltifisering på et tidlig tidspunkt er en utilsiktet effekt av domestisering samt produksjonsbetingelser som kontinuerlig lys (L24:M0), høy vanntemperatur og sjøvannsinnblanding.

Hovedproblemstilling:

- Hvordan påvirker kontinuerlig lysstimuli gjennom hele produksjonszyklusen på settefiskanlegg (LD 24:0) smoltifiseringstrekk hos parr av atlantisk laks?

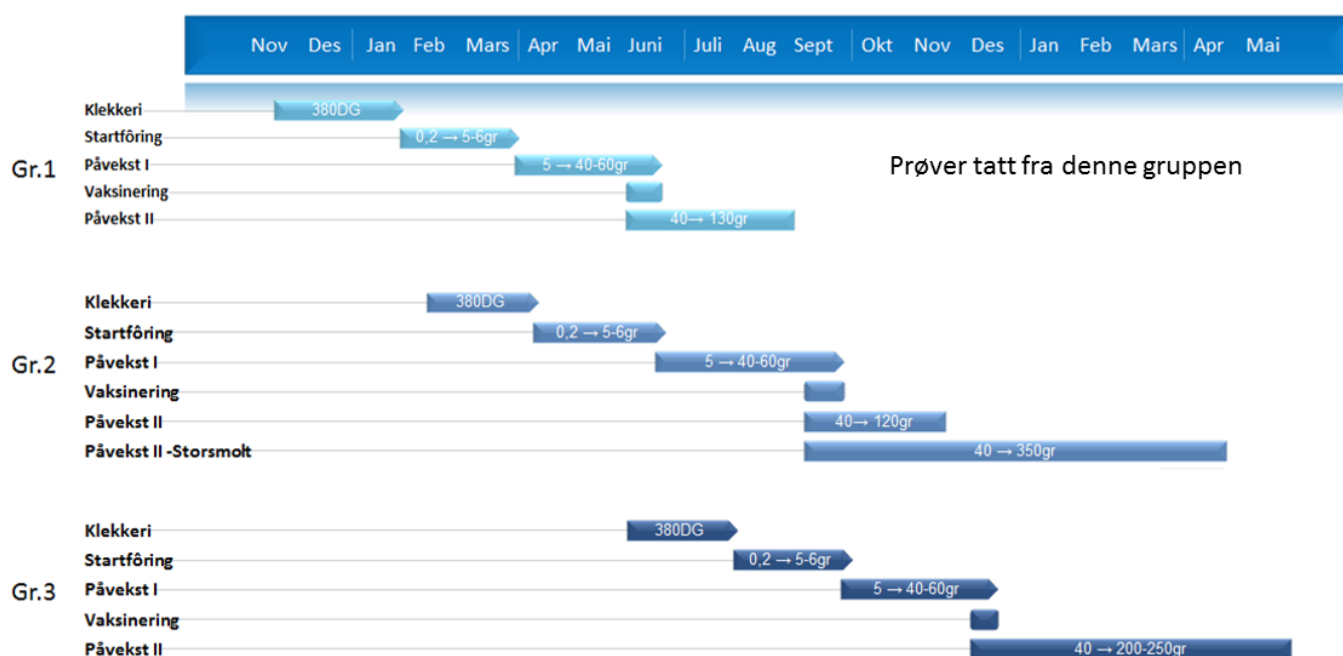
Underproblemstillinger:

1. Er metodene som anvendes for å dokumentere smoltifisering hos Atlantisk laks i kommersiell sammenheng tilstrekkelige til å avgjøre om fisken kan settes i sjø?
2. Fører kontinuerlig belysning gjennom hele produksjonszyklusen til komplett smoltifisering?

2. Materiale og metode

2.1 Fisk og produksjonssyklus

Det ble tatt prøver av Atlantisk laks (*Salmo Salar*) av stammen Mowi. Øyerogna er produsert ved Marine Harvest Norway AS avd. S-T stamfisk og er overlevert Marine Harvest Norway avd. Glomfjord (MHN avd. Glomfjord) den 16.11.2016. MHN avd. Glomfjord er et gjennomstrømnings settefiskanlegg med en konsesjon på 1550 tonn fôr årlig. Anlegget har en maksimal kapasitet på 1400 tonn produsert smolt. I 2018 er det estimert et leveringsantall på 8,8 millioner smolt med snittvekt mellom 140 og 150 gram (Svante Brun MHN avd. Glomfjord, e-post, 17. Januar 2018).



Figur 6: Skjematisk illustrasjon av produksjonsstrategi ved MHN avd. Glomfjord. Gr.1 er den fisken prøvetaking er utført på.

Produksjonen av smolt ved MHN avd Glomfjord er delt i tre grupper som vist i figur 6. Gruppe 1 er produksjon av 0+ og følgende beskrivelse er av denne gruppen.

Øyerogna sto på klekkeri med gjennomsnittlig vanntemperatur på 6 °C over 64 dager (380 Døgngrader, salinitet 0 ‰), før yngelen ble overført til startfôring (Avd. A) 21.01.17. Der var gjennomsnittstemperaturen 14 °C over en periode på 59 dager (salinitet 0 ‰). Fra startfôringsavdeling ble fisken overført til påvekstavdeling 28.03.17 (Avd. B), med gjennomsnittstemperatur på 14 °C og salinitet på 5 ‰. I løpet av neste 10 dager ble saliniteten

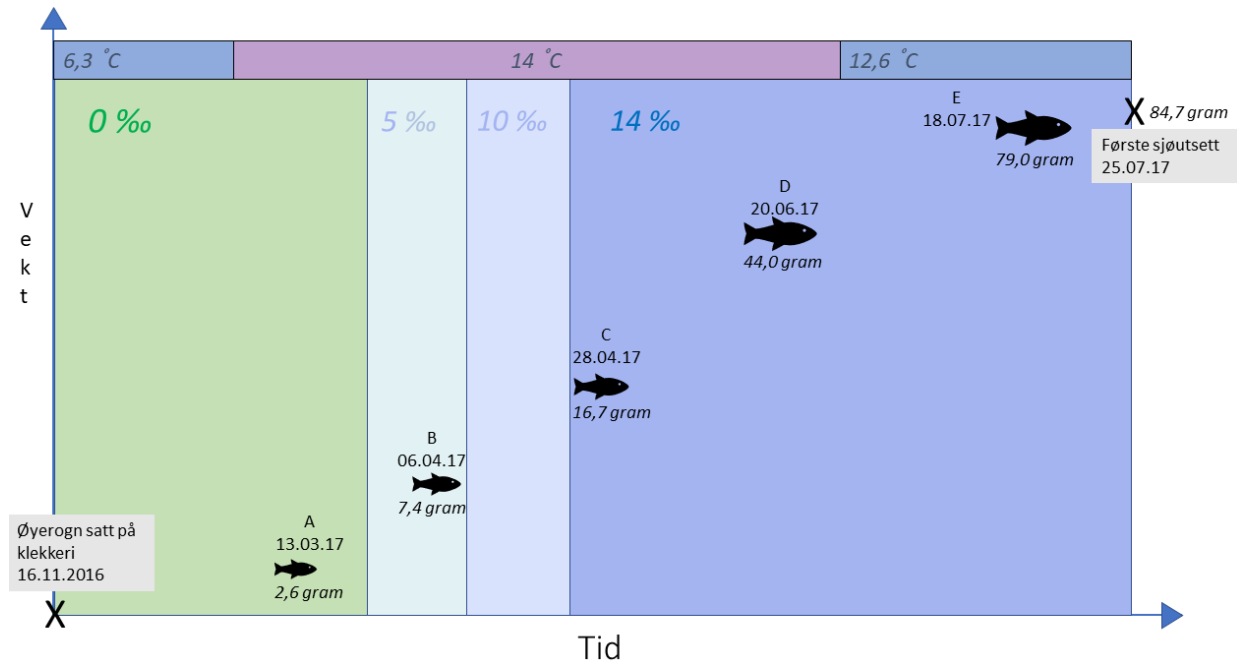
gradvis økt til 10 ‰ (07.04.17), for så å gradvis økes til 14 ‰ i løpet av ytterligere 14 dager. Fisken ble sortert på størrelse 01.05.17, hvor den største fisken (0+) var den som resterende prøveuttak ble utført på (Avd C). Den 14.06.17 ble fisken vaksinert med vaksinetypen Alphaject Micro 6. I resten av produksjonssyklusen var gjennomsnittstemperaturen 12,6 °C og gjennomsnittssalinitet 14 ‰. For kardimensjoner se figur 2. Det har ikke vært større fisketetthet enn 65 kg/m³ i karene. På startfòring ble fisken fòret med Ewos Micro Start. Resten av tiden på anlegget ble fisken fòret med Skretting Nutra Olympic og Skretting Nutra Supreme. Fisken har blitt fòret etter appetitt med tabell som grunnlag og har hatt kontinuerlig belysning (24L:0M) med day-light pærer (hvitt lys) fra enten halogen, lysstoffrør eller LED. Fisken sto under dette lysregimet under hele oppholdet på anlegget. Første del av smoltgruppen ble hentet av brønnbåt for sjøutsett den 25.07.17, mens resten ble satt i sjø ved datoene 09.08.17, 11.08.17 og 27.08.17. Den 10.05.17 ble det påvist Laksepox (*Salmonid gill poxvirus*) på fisken i anlegget. Det ble observert påfølgende høyere dødelighet i en måned.

Tabell 2: Dimensjoner på kar hvor fisken har oppholdt seg

Startfòring	6 m kar (35 m ³)
Avd B	8 m kar (75 m ³)
Avd C	15 m kar (450m ³)

2.2 Prøvetaking

Det ble gjort 5 prøveuttak ved MHN avd Glomfjord, hvilke ble navngitt med bokstavene A- E. Hvert uttak besto av 1 blodprøve og 2 gjelleprøver fra hver fisk. For hvert uttak ble det tatt prøver fra 3 ulike kar (triplikat), hvorav 15 fisk fra hvert kar. Uttakene er gjort ved følgende datoer, A: 13.03.17, B: 06.04.17, C: 28.04.17, D: 20.06.17, E:18.07.17 (Figur 7).



Figur 7: Skjemaet viser de ulike prøveuttakene (A-E) i de ulike fasene av produksjonssyklusen for gruppe I. Øvre kant viser temperatur mens heldekkende fargefelt viser salinitet. Oppgitte verdier er gjennomsnittsverdier.

15 fisk ble håvet fra kar og raskt flyttet til en bønne med 5 mg/l av anestesimiddelet Metomidate (Aquacalm vet., Scan Aqua AS). Etter at fisken hadde oppnådd full bedøvelse (anestesifase 4, (Schoettger & Julin, 1967)), ble en og en tatt fra bønne og avlivet med slag mot hodet. Blod ble tatt fra halevenen ved hjelp av 0,50x16 hepariniserte sprøyter og sentrifugert ved 5000 rpm i 12 min. Blodplasma ble pipettert over i merkede eppendorfrør som ble lagret i prøveglassbokser på -20 °C fryser. Det ble ikke tatt blod fra fisk i uttak A, da disse var for små til å få ut tilstrekkelige mengder.

Fra hver fisk ble det skåret ut ½ gjellebue som ble lagt i cryorør med SEI-buffer (for innhold se vedlegg 1) og deretter lagret på -80 fryser. Dette var for NKA enzymaktivitetsanalyse. ½ gjellebue fra samme fisk ble lagt på 2 ml cryorør med 400 ul RNAlater® (lagret på -80 fryser) for NKA-mRNA-uttryksanalyse. Vekt (g) og gaffellengde (mm) ble notert for hver fisk.

I forbindelse med hvert prøveuttak ble 15 fisk fra hvert av de samme tre karene satt på en 24-timers sjøvannstest. Det var tre bølter, en for hvert kar, med gjennomstrømming av sjøvann hvor saliniteten var 32 ‰ og temperatur 7,7 °C (± 0,5 °C). Når 24 timer var gått ble det tatt blodprøver fra disse fiskene etter samme prosedyre som beskrevet ovenfor, samt at vekt og gaffellenge ble notert for hver fisk.

2.4 Vekst

Kondisjonsfaktor på fisken ble regnet ut etter Fultons formel (Fulton, 1902).

$$K = \frac{100000 * Vekt(g)}{Lengde^3(mm)}$$

SGR (Specific growth rate) ble regnet ut etter følgende formel (Houde & Schekter, 1981):

$$SGR = 100 * [(\ln W_2 - \ln W_1) / \Delta T]$$

hvor W2 er sluttvekt, W1 er startvekt mens ΔT er antall dager mellom vektmåling.

TGC (Thermal growth coefficient) ble regnet ut etter følgende formel (Iwama & Tautz, 1981):

$$TGC = \left(\frac{\sqrt[3]{W_2} - \sqrt[3]{W_1}}{T * t} \right) * 1000$$

Hvor W2 er sluttvekt, W1 er startvekt, T er antall dager mellom målinger og t er gjennomsnittstemperatur i perioden.

2.3 Analyser av blod

Før alle blodanalysene ble eppendorfrørene med den opptinte blodplasmaen ristet i ca. 2 sekunder med en ZX4 Advanced IR Vortex Mixer (Velp® Scientifica, Usmate, Italy). Dette for å homogenisere blodplasmaen.

2.3.1 Plasmaklorid

Klorid-innholdet i 20 µl blodplasma pr. prøve ble målt med et Sherwood Chloride Analyser 926 s (Sherwood Scientific LTD, UK) og oppgitt i mmol/l.

2.3.2 Plasmaosmolalitet

Osmolaliteten ble målt med et Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, Norwood, MA, USA) og oppgitt i mOsm/kg (mOsm).

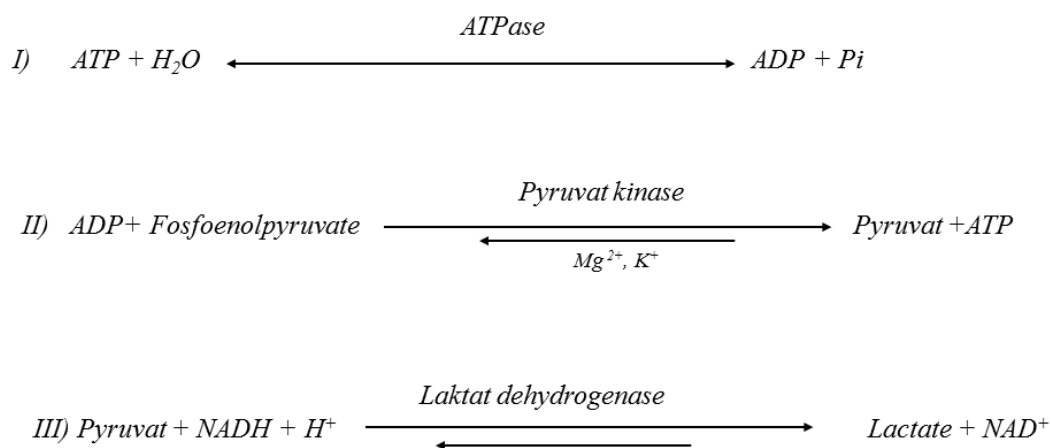
2.3.3 Plasmamagnesium

Analysekit Fluitest[®] MG XB (Analyticon[®] Biotechnologies AG, Tyskland) ble brukt til å måle Magnesium (Mg^{2+}) nivå i blodplasma. 10 μ l blodplasma fra hver prøve ble fortynnet i 1 ml reagens (Tris buffer pH 11, xylidylblått, detergent) per brønn i en 96 brønners nunc-plate (duplikat, to brønner pr prøve). Dette ble inkubert i 10 min ved 22 °C. Sammen med xylidylblått danner magnesium et lilla complex. Fargeintensiteten (lilla) er proporsjonal med konsentrasjonen av magnesium. Blank prøve og magnesium standardprøve ble kjørt samtidig som vanlige prøver. Prøvene ble avlest fotometrisk ved 520 nm på en Tecan Sunrise[™] plateleser (Tecan Group Ltd, Sveits) og analysert på PC ved hjelp av Tecan Magellan[™] data analyse programvare (Tecan Group Ltd, Sveits). Magnesiumverdiene i blodplasma ble oppgitt i mmol/l.

2.5 Analyse av Na^+ , K^+ -ATPase enzymaktivitet i gjelle

Metoden som ble brukt for å måle Na^+ , K^+ -ATPase aktivitet i fiskens gjeller er beskrevet av McCormick (1993) og Shrock et al. (1994).

I korte trekk baserer metoden seg på at hydrolysen av adenosintrifosfat (ATP) ned til adenosindifosfat (ADP) og fosfor(P_i) er enzymatisk koblet til omdannelsen av NADH (nikotinamid-adenin-dinukleotid) til NAD^+ . Det vil si at produksjonen av ADP fra ATP i nærvær av enzymet Na^+ , K^+ -ATPase, resulterer i en tilsvarende reduksjon av NADH til NAD^+ . Denne reduksjonen kan måles ved å se på endring i optisk tetthet (OD) i en mikroplate-leser. Mengden ADP produsert gir da grunnlag for å kalkulere mengde Na^+ , K^+ -ATPase (Figur 8). Denne mengden korrigeres opp mot en standardkurve med kjente mengder ADP (0, 5, 10, 20 nmol) og totalt proteininnhold.



Figur 8: Basisreaksjonen i Na^+, K^+ -ATPase enzymaktivites analyse.

Før prøvene ble tatt opp fra fryser ble alle kjemikalieløsninger gjort klare (se vedlegg 1). Når de 24 prøvene (plass til 24 prøver pr mikroplate) var tatt opp fra fryser og tint, ble gjellebuen lagt på en petriskål på is. 4-6 gjellefilamenter ble kuttet av og lagt i 0,5 ml eppendorfrør med 100 μl SEI buffer (vedlegg 1). 25 μl 0,5 % SEID buffer (vedlegg 1) ble tilsatt. Dette ble homogenisert med en mototisert «pestle mixer» i 10 sekunder. For at celleavfall skulle utfelles ble prøvene sentrifugert ved $5000 \times g$ i 1 min ved 4°C . 10 μl av prøven ble pipettert i hver brønn (4 replikater) i en Nunc -plate. Når halvparten av prøvene (12) var pipettert over i platene, ble assay mixture A (AM, vedlegg 1) og assay mixture B (AM-O, vedlegg 1) som var ferdigblandet med salt-løsning (vedlegg 1), satt i vannbad med temperatur 25°C . Når alle 24 prøvene var pipettert over i mikroplata, ble 200 μl av løsning AM, som var uten enzymhemmeren quobain, tilsatt i to av prøvebrønnene. 200 μl av AM-O, som var med enzymhemmeren quobain, ble tilsatt i de to andre prøvebrønnene. Mikroplata ble plassert i en plateleser og lest av på bølgelengde 340 nm ved 25°C i 10 minutter (10 sekunders intervall).

Analyse av proteininnhold ble utført med et PierceTM BCA Protein Assay Kit Produktnr. 23225 (Rockford, IL 61105 USA). 3 replikater (10 μl) fra resterende homogenat ble pipettert i hver brønn i en Costar plate (CLS 9017 Sigma Aldrich). 200 μl reaksjonsløsning (vedlegg 1) ble tilsatt i hver brønn. I øvre venstre hjørne av plata ble 10 μl BSA standard mixture pipettert i (0, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$, triplikat per konsentrasjon, 12 brønner). Plata ble satt i en plate-rister i 30 sek, før den ble dekt med parafilm og inkubert ved 37°C i 30 min. Etter 2-3 min avkjøling ble den satt i plateleser og avlest ved 562 nm.

Utgangspunkt i utregning av mengde ADP ble gjort ved å bruke standardkurven. Mengden protein per prøve og standardkurven ble brukt til å beregne Na^+ , K^+ -ATPase aktivitet uttrykt som $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$.

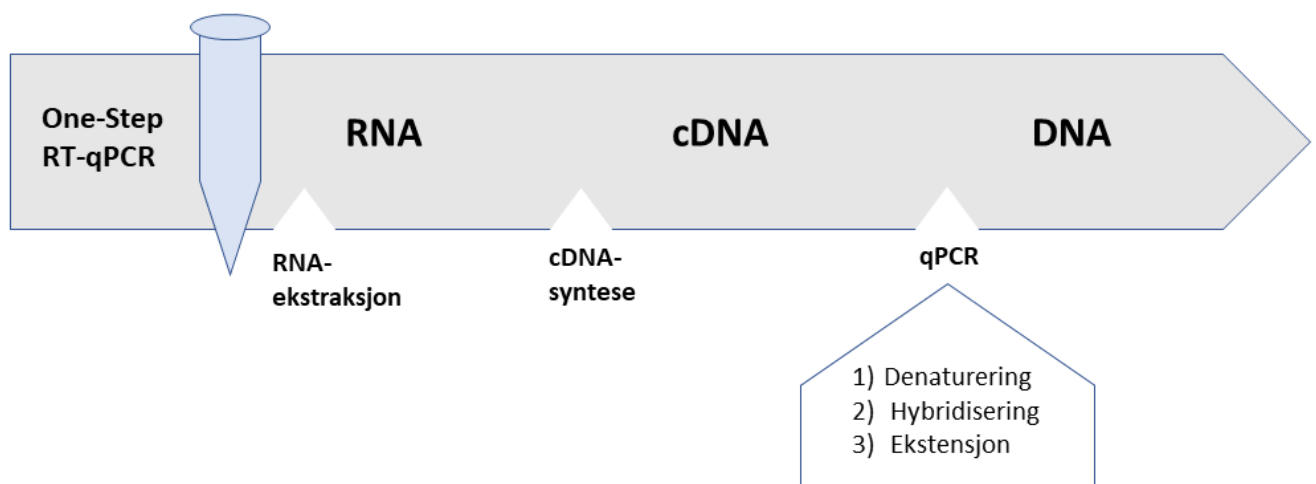
2.6 Analyser av Na^+ , K^+ -ATPase mRNA-uttrykk

mRNA-uttrykk av enzymet Na^+ , K^+ -ATPase isoformer $\alpha 1a$ og $\alpha 1b$ ble målt i gjellevev fra fisken med RT qPCR (Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction) metode. Denne metoden baserer seg på PCR (Polymerase Chain Reaction) metoden, som tar utgangspunkt i kopiering av DNA- sekvenser ved hjelp av et varmestabilt enzym, Taq-polymerase, og primere. Primere er oligonukleotider med en bestemt DNA sekvens. RT qPCR kvantifiserer i tillegg oppkopiering av spesifikke DNA sekvenser ved hjelp av et fluoriserende lyssignal fra en probe (enkeltrådig DNA-sekvens merket med fluoriserende fargestoff). Lyssignalet registreres av et analyseinstrument. Proben binder seg til en spesiell gensekvens på DNA strengen, og lyssignalet aktiveres når primeren, som forlenges av enzymet Taq polymerase, treffer proben. Mengden lyssignal er derfor proporsjonal med antall genkopier som lages. I startfasen settes en grunnverdi på antall genkopier som produseres. Når det er signifikant økning i lyssignal i forhold til grunnverdien, settes en terskelverdi (threshold). Antallet sykluser som gir lyssignal-verdi høyere en terskelverdi, kalles C_t – verdi (Threshold Cycle). Vis utbredelsen av målgenet er liten i prøven, vil antallet sykluser som trengs for å passere terskelverdi være høy, altså høy C_t – verdi. Ved høyt antall av målgenet, vil terskelverdien tidlig passerer, noe som gir lav C_t – verdi. Metoden gir en relativ kvantifisering av mRNA-uttrykk for et gen i en gruppe av prøver, sammenliknet med mRNA-uttrykk for samme gen i en annen gruppe prøver. (LifeTechnologies, 2012).

RT qPCR analyse består av fasene RNA-ekstraksjon, cDNA syntese og PCR sykluser (Figur 9). cDNA er DNA som er syntetisert ved hjelp av enzymet revers-transkriptase med enkeltrådig mRNA som templat. Resultatet er enkelttrådet cDNA klar for PCR sykluser. I dette tilfellet er det brukt en One Step RT qPCR. Dette innebærer at cDNA syntesen og PCR-syklusene foregår i samme brønn, noe som reduserer risikoen for kontaminering av prøvemateriale da man reduserer antallet pipetteringer. Denne formen for RT qPCR krever genspesifikke primere (LifeTechnologies, 2012).

Det er tre hovedsteg i en PCR syklus: 1) Denaturering 2) Hybridisering 3) Ekstensjon. Under denaturering utsettes DNA for høy temperatur, slik at den dobbeltstrengede DNA-strukturen

brytes ned til enkeltstrenger. Dette for at primer og prober skal kunne feste seg. Da vi brukte One-Step RT-qPCR virket denne denatureringen først ved andre syklus, ettersom enkelttrådig cDNA var startpunktet. Under hybridisering brukes en spesifikk temperatur for å tilrettelegge for festing av primere og prober. Ved ekstensjon settes temperaturen til 70-72 grader, hvor taq-polymerase forlenger primeren og syntetiserer ny DNA tråd mest effektivt. Dette kan skje med en hastighet opp mot 100 baser per sekund. For at taq-polymerasen skal kunne feste seg til de enkeltrådede DNA strengene, må det foreligge en forover og en revers-primer (LifeTechnologies, 2012).



Figur 9: Figuren viser forløpet av en One-Step RT-qPCR analyse

2.6.1 Ekstraksjon av RNA fra gjellevev

RNA ekstraksjon fra gjellevev ble gjort med E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I (Omega Bio-tek Norcross, GA 30071) og utført i henhold til medfølgende protokoll. Følgende beskrivelse er etter protokoll.

Før start ble RNA Rens Buffer II uttynnet i 100 % etanol og lagret i romtemperatur. 10 mg gjellevev av hver prøve ble satt i 2 ml eppendorfrør med 350 ul lysisbuffer og keramiske perler. Dette ble homogenisert med Precellys Evolution homogenisator (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux FRANCE) i 2 x 30 sekunder på 5800 rpm. Deretter ble prøven sentrifugert i 5 minuttter ved 14000 x g og 4 °C (Heraeus Fresco 21, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Supernatanten ble overført til 1,5 ml microsentrifuge-tuber, tilsatt 1 volum 70% etanol og ristet grundig.

700 ul prøvevæske ble overført til HiBind[®] RNA Mini Column (kolonne) satt i en 2 ml tube og sentrifugert ved 10000 x g i 1 min. Filtratet ble kastet og siste punkt ble gjentatt til alt av prøvevæske var kjørt gjennom kolonnen.

500 ul av RNA Rens Buffer I ble tilsatt kolonnen. Dette ble sentrifugert ved 10000 x g i 1 min. Filter ble kastet. 500 ul av RNA Rens Buffer II uttynnet i 100 % etanol ble tilsatt kolonnen. Dette ble sentrifugert ved 10000 x g i 1 min. Filtratet ble kastet. Siste punkt ble gjentatt en gang.

Den tomme kolonnen ble sentrifugert ved 14000 x g i 2 min for å fjerne etanolrester. Kolonnen ble satt i en ren 1,5 ml mikrosentrifuge-tube. 30 ul RNase-fritt vann tilsatt kolonnen og sentrifugert i 2 min ved 14000g og 4 °C. Eluert RNA på mikrosentrifuge-tuben ble lagret i -80 °C fryser.

2.6.2 RT qPCR

Det ble kjørt en duplex reaksjon med en taq-man[®] probe til hver primer. Målgene var NKA α 1a eller NKA α 1b. Kontrollgenet var elongeringsfaktor (EF1A_A).

Essay til målgene besto av primer (forover og revers) med en konsentrasjon på 900 nM og 6FAM-merket prober med en konsentrasjon på 250 nM. Disse er publisert av Nilsen et al. (2007) (Tabell 3).

Essay til elongeringsfaktor besto av primer (forover og revers) med konsentrasjon på 900 nm og Cy5-merket probe med konsentrasjon 250 nm (Tabell 2). Disse er publisert av Olsvik et al.(2005) (tabell 3).

Total reaksjonsmiks besto av 6 ul qScript XLT One-step RT-qPCR ToughMix (mastermiks, QuantaBio, Beverly MA 01915), assay for målgen (0,6 ul), assay for elongeringsfaktor (1,1 ul) nuklease fritt vann (2,3 ul) og RNA templat (2 ul). Totalt volum pr. reaksjon var 12 ul. Det ble brukt 96 brønners costar plate, hvor brønn A1 til D9 hadde reaksjonsmiks med målgen NKA α 1a (45 prøver), og brønn E1 til H9 reaksjonsmiks med målgen NKA α 1b (45 prøver). Prøvene ble kjørt uttaksvis (A – E), det vil si et uttak pr plate. Hver plate hadde 6 NTC (Non template control) brønner.

RT qPCR faser var som følger (etter protokoll):

- cDNA-syntese ved 50 C° i 10 minutter
- Første denaturering ved 95 C° i 1 minutt.
- PCR sykluser (45 sykluser) først ved 95 C° i 10 sekunder, deretter ved 60 C° i 60 sekunder.

PCR sykluser utført med LightCycler[®] 96 (Roche).

Resultatet kommer som C_t-verdier for begge målgen (NKA α 1a, NKA α 1b) samt kontrollgen (EF1A_A).

Tabell 3: Gensekvenser av PCR primere og prober brukt til å kvantifisere mRNA-uttrykket av NKA α 1a og NKA α 1b.

Gen		Primer	Prober	Gen bank accession no.
NKAα1a	Forward	CCAGGATCACTCAATGTCCTCT	ACGATTACATTATAAGGCAATACT	CK878443
	Reverse	GCTATCAAAGGCAAATGAGTTTAAT ATCATTGTAAAA		
NKAα1b	Forward	GCTACATCTCAACCAACAACATTAC AC	ACCATTACATCCAATGAACACT	CK879688
	Reverse	TGCAGCTGAGTGCACCAT		
EF1A_A	Forward	CCCCTCCAGGACGTTTACAAA	ATCGGTGGTATTGGAAC	AF321836
	Reverse	CACACGGCCACAGGTACA		

2.6.3 Behandling av data

Relativ endring i NKA α 1a og NKA α 1b uttrykk:

Den relative endringen i mRNA-uttrykk av NKA α 1a og NKA α 1b ble regnet ut ved hjelp av $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoden (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). C_t -verdiene for kontrollgen (EF1 α) og målgen (NKA α 1a og NKA α 1b) ble satt i et Microsoft Excel ark. C_t -verdier for uttak A ble brukt som referansepunkt. Utrekning er som følger:

Relativ endring i forhold til uttak A

$$= 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$= 2^{-((C_t \text{ målgen uttak x} - C_t \text{ kontr.gen uttak x}) - (C_t \text{ målgen uttak A} - C_t \text{ kontr.gen uttak A}))} = e$$

$$= \frac{-1}{e}$$

Eksempelvis:

C_t -verdi uttak A: NKA α 1a (målgen)= 16,5

EF1 α (kontrollgen)=14,5

C_t -verdi uttak B: NKA α 1a (målgen)= 17,7

EF1 α (kontrollgen)=15,5

Relativ endring i mRNA-uttrykk fra uttak A til B blir da:

$$= 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$= 2^{-((17,7 - 15,5) - (16,5 - 14,5))}$$

$$= 0,87$$

$$= \frac{-1}{0,87}$$

$$= -1,14.$$

mRNA-uttrykket av NKA α 1a er redusert med 1,14 ganger (fold) fra uttak A til uttak B.

Indeks:

For å analysere differansen mellom genuttrykket for NKA α 1a (Målgen A) og NKA α 1b (Målgen B) ble det regnet ut en indeks.

Denne ble regnet ut på følgende måte:

$$\Delta C_t = C_t \text{ Målgen} - (C_t \text{ elongeringsfaktor} - 10).$$

10 ble trukket fra elongeringsfaktor for å unngå at ΔC_t verdi ble pluss eller minus ved en tilfeldighet, ettersom C_T -verdiene for elongeringsfaktor og målgen var noe lik.

Deretter ble en $\Delta\Delta C_t$ verdi regnet ut på følgende måte:

$$\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t \text{ målgen A}) - (\Delta C_t \text{ målgen B})$$

Ut i fra $\Delta\Delta C_t$ -verdien ble en indeks regnet ut:

$$2^{(-\Delta\Delta C_t)}.$$

Indeksen gir et bilde på forskjellen i genuttrykk mellom NKA α 1a og NKA α 1b, etter at hver av dem er korrigert opp mot elongeringsfaktor.

2.7 Morfologiske trekk

Ved uttak A ble det observert 3 ulike utseendemessige versjoner av parren. Dette var brun med parmerker, blank med parmerker og blank uten parmerker. Denne klassifiseringen ble brukt ved alle uttak og antallet av de tre ulike versjonene ble registrert for hvert uttak.

2.8 Statistikk

Statistiske tester ble utført i JMP[®], R[®] og Microsoft excel[®]. Shapiro Wilk-test og Kolmogorov-Smirnov test ble brukt til å avgjøre homogenitet og normalfordeling. Data for NKA-enzymaktivitet og indeks ble log-transformert for å oppnå normalfordeling.

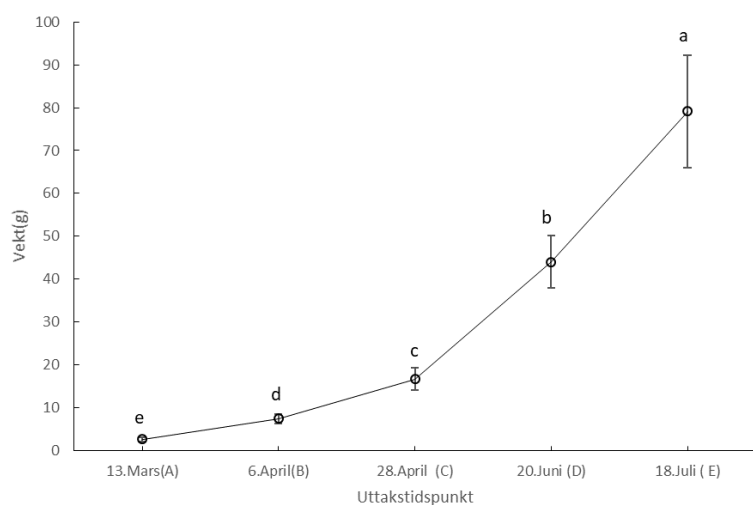
Enveis ANOVA ble brukt for å teste for forskjeller mellom uttak, samt mellom grupper innad i uttak. Ved indikasjoner på signifikante forskjeller mellom uttakstidspunkter eller mellom produksjonskar og sjøvanntest innen samme uttak ble Tukey Kramer HSD post hoc test brukt. Signifikansnivå var 0,05.

Figurer ble laget i Microsoft Excel.

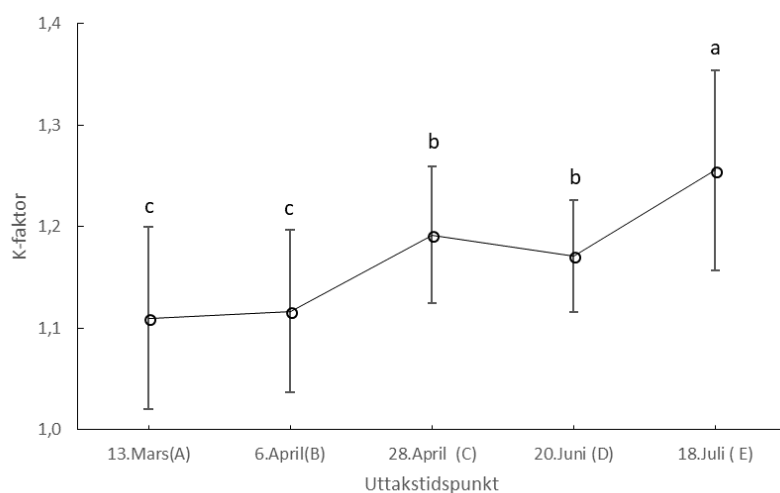
3. Resultat

3.1 Vekst

Fisken hadde en signifikant økning i vekst mellom hvert prøveuttak ($p < 0,05$) (Figur 10). Laveste og høyeste registrerte individvekt i løpet av prøveperioden var henholdsvis 1,7 gram og 115,5 gram. K-faktor viste ingen signifikant endring mellom uttakene A og B ($p = 0,99$), eller uttak C og D ($p = 0,91$). K-faktor økte signifikant mellom uttak B og C ($p < 0,0001$) samt uttak D og E ($p < 0,0001$) (figur 11).

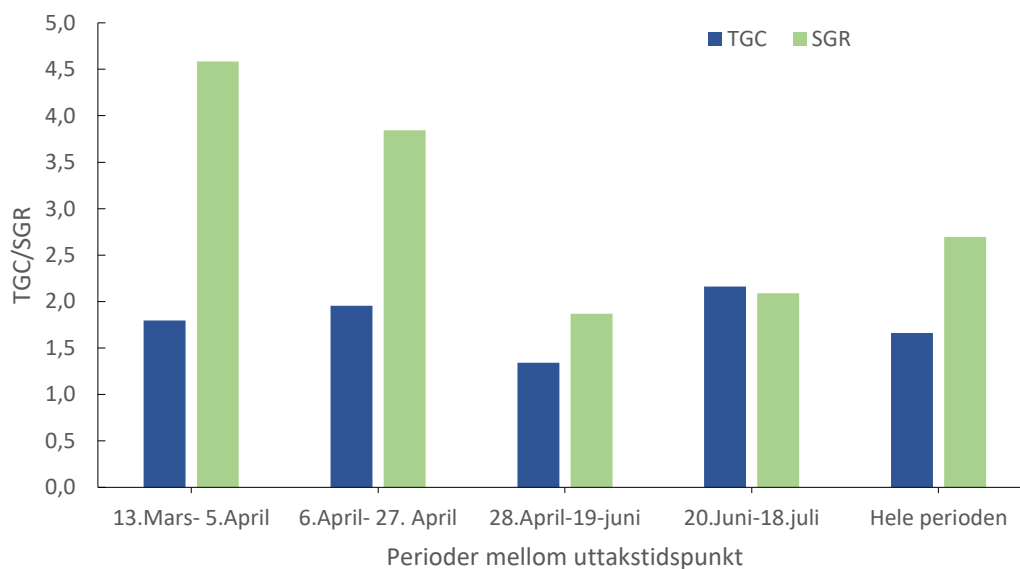


Figur 2: Figuren viser gjennomsnittlig k-faktor på fisken det er tatt prøver av ($n=45$), fordelt på de ulike uttakstidspunktene. Grupper med ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom uttak. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.



Figur 3: Figuren viser gjennomsnittsvekt på fisken det er tatt prøver av ($n=45$), fordelt på de ulike uttakstidspunktene. Grupper med ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom uttakstidspunkt. Standardavvik ($\pm SD$) er illustrert med vertikale streker.

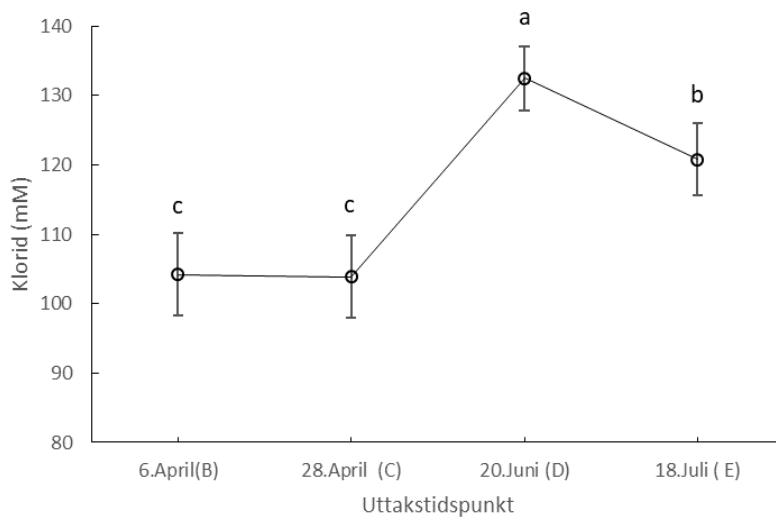
Perioden 13. mars- 6.april hadde høyest SGR med 4,4, mens lavest SGR ble målt i perioden 28 april -19 juni. Denne var på 1,84. Laveste og høyeste TGC var henholdsvis 1,32 i perioden 28 april – 19 juni, og 2,16 mellom 20 juni og 18 juli. TGC og SGR for hele perioden var henholdsvis 1,66 og 2,70 (Figur 12).



Figur 12: Figuren viser gjennomsnittlig TGC (Thermal growth coefficient) og SGR (Spesific Growth Rate) for periodene mellom prøveuttakene samt hele perioden.

3.2 Plasmaklorid

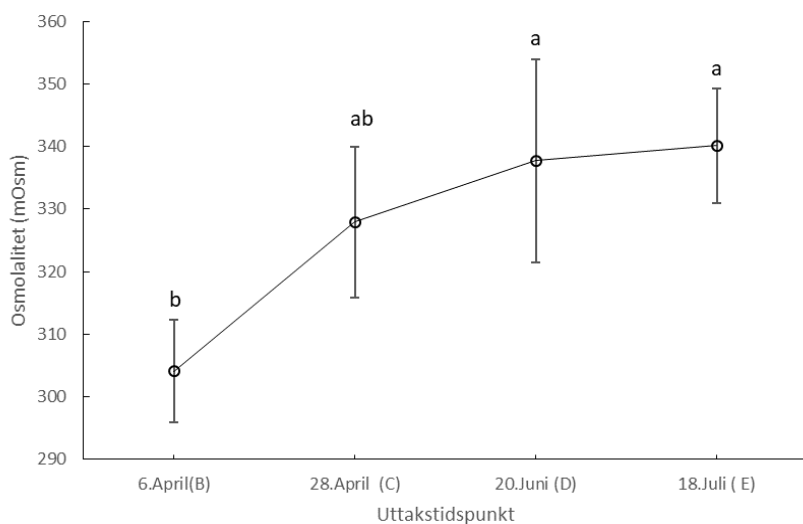
Høyeste gjennomsnittlige kloridnivå hos fisk i brakkvann ble målt i uttak D med 132,48 mM (Standardavvik (SD) $\pm 4,62$). Dette var signifikant høyere enn de andre uttakene ($p < 0,0001$). Det var ingen signifikant endring mellom uttak B og C ($p = 1,0$). Laveste måling var uttak C med 103,87 ($\pm 5,95$) (Figur 13).



Figur 13: Figuren viser gjennomsnittlig kloridverdi i fiskens blodplasma på de ulike uttakstidspunktene ($n = 45$). På uttak B sto fisken i 5 % salinitet, mens det var 14 % ved resterende uttak. Grupper uten felles bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom uttak. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

3.3 Plasmaosmolalitet

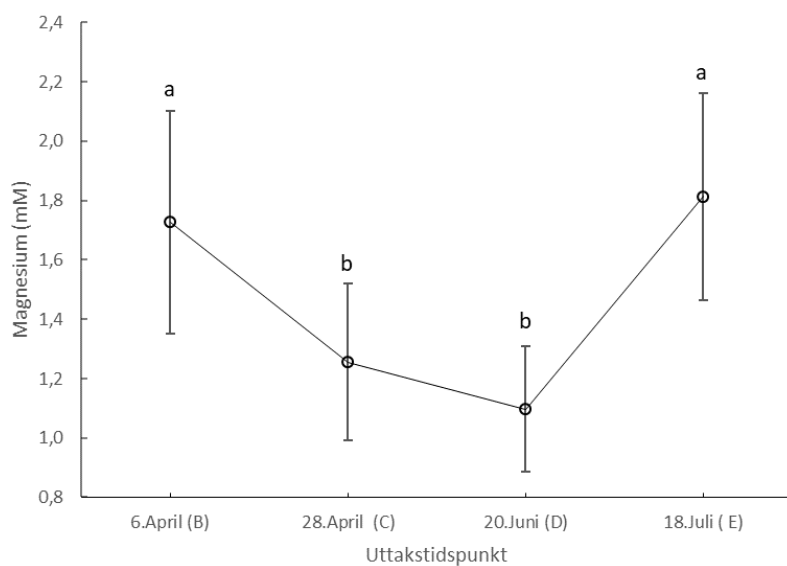
Osmolaliteten i blodplasma var høyest ved uttak E med 340,15 mOsm ($\pm 9,14$). Laveste verdi ble målt ved uttak B med 304,09 mOsm ($\pm 8,17$). Denne målingen var signifikant forskjellig fra uttak D og E ($p < 0,0001$). Det var ikke signifikant forskjell mellom uttakene C og D ($p = 0,81$) eller D og E ($p = 1,0$) (Figur 14).



Figur 14: Figuren viser gjennomsnittlig osmolalitet i fiskens blodplasma på de ulike uttakstidspunktene (n=45). På uttak B sto fisken i 5 ‰ salinitet, mens det var 14 ‰ ved resterende uttak. Grupper uten felles bokstav er signifikant forskjellige. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

3.4 Plasmamagnesium

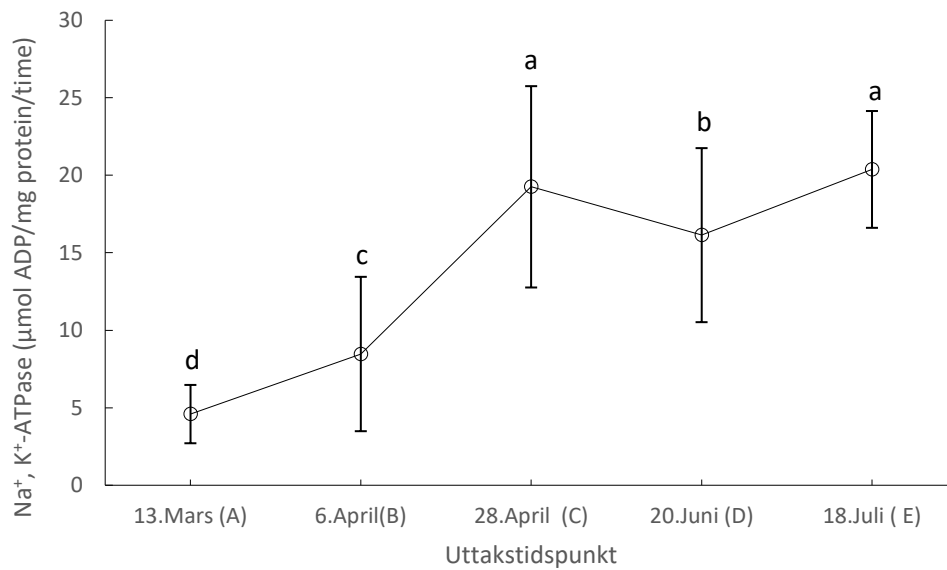
Høyeste og laveste magnesiumnivå i blodplasma var henholdsvis uttak E med 1,81 mM ($\pm 0,34$), og uttak D med 1,10 mM ($\pm 0,21$). Verdien sank signifikant mellom uttak B og C ($p = 0,0123$), mens den steg signifikant mellom uttak D og E ($p < 0,0001$) (Figur 15).



Figur 15: Figuren viser gjennomsnittlig magnesiumverdi i fiskens blodplasma på de ulike uttakstidspunktene (n=45). På uttak B sto fisken i 5 ‰ salinitet, mens det var 14 ‰ ved resterende uttak. Grupper uten felles bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom uttak. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

3.5 Gjelle Na⁺, K⁺-ATPase enzymaktivitet

Laveste og høyeste målte NKA enzymaktivitet var henholdsvis 4,6 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$ på uttak A ($\pm 1,88$) og 20,4 $\mu\text{mol ADP/mg protein/time}$ på uttak E ($\pm 3,76$). Verdien steg signifikant mellom uttak A og uttak B, B og C ($p < 0,0001$), samt sank signifikant mellom uttak C og D ($p = 0,0456$). NKA enzymaktiviteten var signifikant høyere ved siste uttak i forhold til første ($p < 0,0001$) (Figur 16).

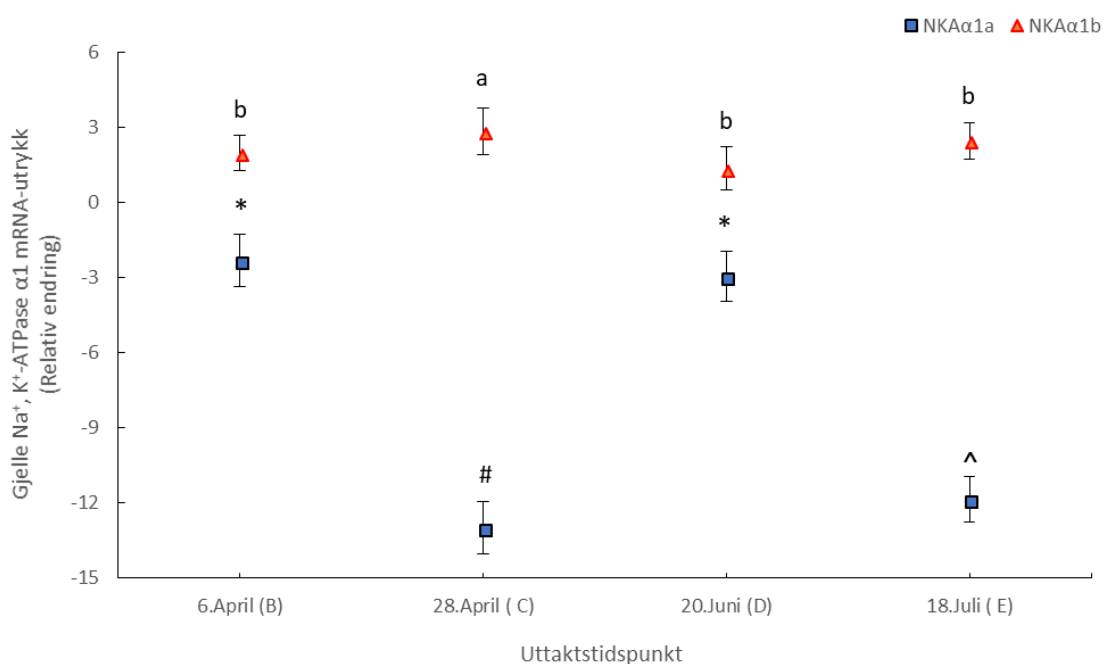


Figur 16: Figuren viser gjennomsnittlig gjelle Na⁺, K⁺-ATPase enzymaktivitet på de ulike uttakstidspunktene ($n=45$). Salinitet var som følger: Uttak A=0 ‰, uttak B = 5 ‰, Uttak C-E =14 ‰. Grupper uten felles bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom uttakstidspunkt. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

3.6 Gjelle Na⁺, K⁺-ATPase mRNA-uttrykk

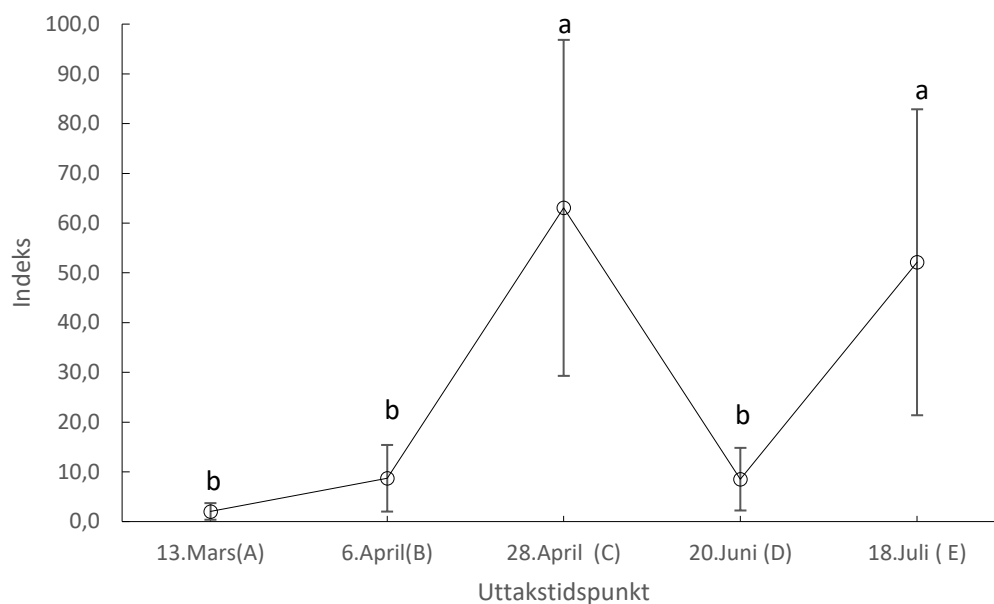
Største og minste relative endring i mRNA uttrykk i forhold til uttak A for NKAα1a var henholdsvis 13,0 folds reduksjon ($\pm 1,09$) ved uttak C og 2,9 folds reduksjon ($\pm 1,03$) ved uttak B. Verdien ved uttak C var signifikant lavere enn de andre uttakene ($p < 0,05$) (Figur 16).

For NKAα1b var største og minste relative endring i mRNA-uttrykk henholdsvis 2,85 folds økning ($\pm 1,06$) i uttak C og 1,36 folds økning ($\pm 0,85$) i uttak D. Verdien for uttak C var signifikant høyere enn de andre uttakene ($p < 0,05$). Det var ikke signifikant forskjell mellom verdiene for uttak B, D og E (Figur 17).



Figur 4: Figuren viser relativ endring i mRNA-uttrykk av Na⁺, K⁺-ATPase α1a og Na⁺, K⁺-ATPase α1b i gjellevev. Uttak A er referanseverdien. Verdiene for uttak B-E viser hvor mange folds endring det er i mRNA-uttrykk i forhold til uttak A. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom uttakstidspunkt for NKAα1b. Ulike figurer indikerer signifikante forskjeller mellom uttakstidspunkt for NKAα1a. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

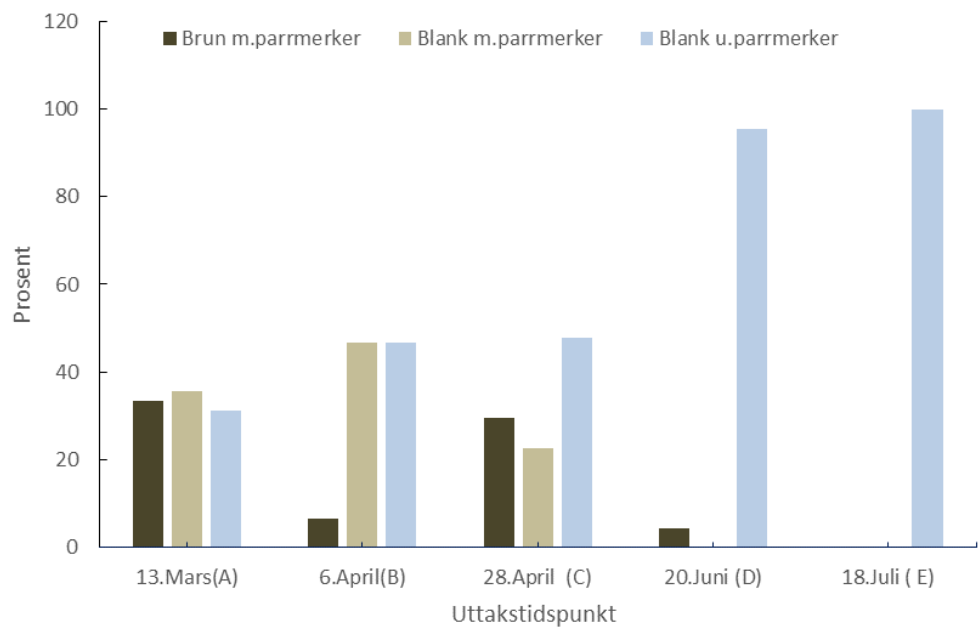
Høyeste og laveste indeksverdi var henholdsvis 63,1 ($\pm 33,7$) på uttak E og 2,0 ($\pm 1,6$) på uttak A. Indeksen for uttak C var signifikant høyere enn uttak A, B og D (p -verdi $< 0,0001$). Det var ingen signifikant forskjell mellom uttak C og E ($p = 0,11$), mellom A og D ($p = 0,28$) eller B og D ($p = 1,00$) (Figur 18).



Figur 5: Figuren viser indeks for de ulike uttakene (n=45). Indeksen er et mål på differansen i gjelle mRNA-genuttrykk mellom Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1a$ og Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1b$. Grupper uten felles bokstav indikerer signifikante forskjeller mellom uttakstidspunkt. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

3.7 Morfologiske smoltifiseringstrekk

Ved uttak A ble det observert 3 ulike utseendemessige versjoner av parren. Dette var brun med parrmerker, blank med parrmerker og blank uten parrmerker (Figur 20A). Antallet av disse tre ulike versjonene ble registrert for hvert uttak (n=45). I uttak A var det tilnærmet lik fordeling mellom de ulike versjonene, mens det var betraktelig lavere andel brune med parrmerker enn de to andre versjonene ved uttak B (6,6 %). I uttak C dominerte blanke uten parrmerker (47,7%), hvor det var lavest andel blanke med parrmerker (22,7%) (Figur 19). I uttak D var tilnærme alle blanke uten parrmerker (95,5%), mens i E var alle blank uten parrmerker (Figur 19, figur 20B).



Figur 19: Figuren viser prosentvis fordeling av de 3 ulike utseendemessige versjonene, fordelt på de ulike uttakene.



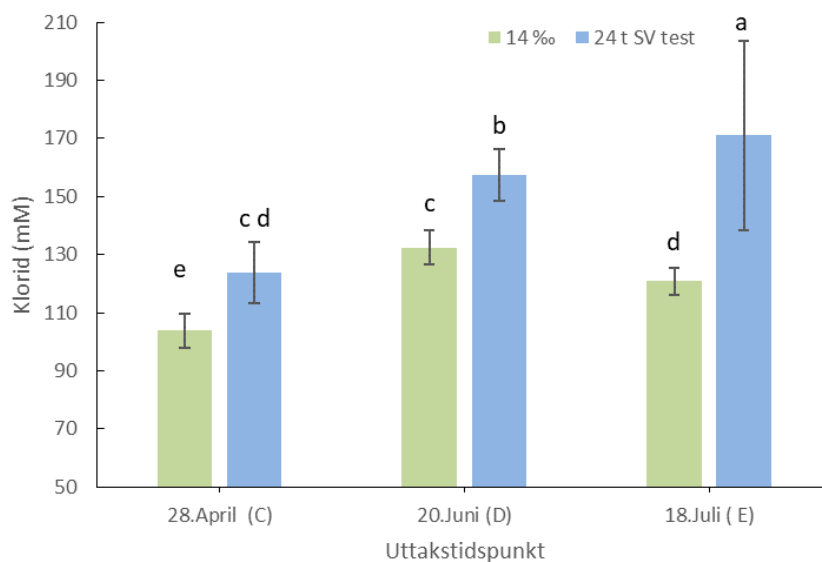
Figur 20: A: Det ble observert 3 ulike utseendemessige versjoner av parren ved uttak A. B: Fisk ved uttak E hadde var alle blank uten parrmerker. Begge foto: Carl Ruben Ærø

3.8 Sjøvannstester

Det ble gjennomført 24 timers sjøvannstester ved hvert prøveuttak. I uttakene A og B døde flere individer i starten av sjøvannstesten. Den ble derfor avsluttet av dyrevelferdsmessige årsaker før 24 timer var gått. Derfor er ikke disse to uttakene representert i figurene for sjøvannstester. Ved uttak E var 8 av 45 fisk meget redusert (buken opp) etter 24 timer, en dødelighet på 17 %.

3.8.1 Plasmaklorid

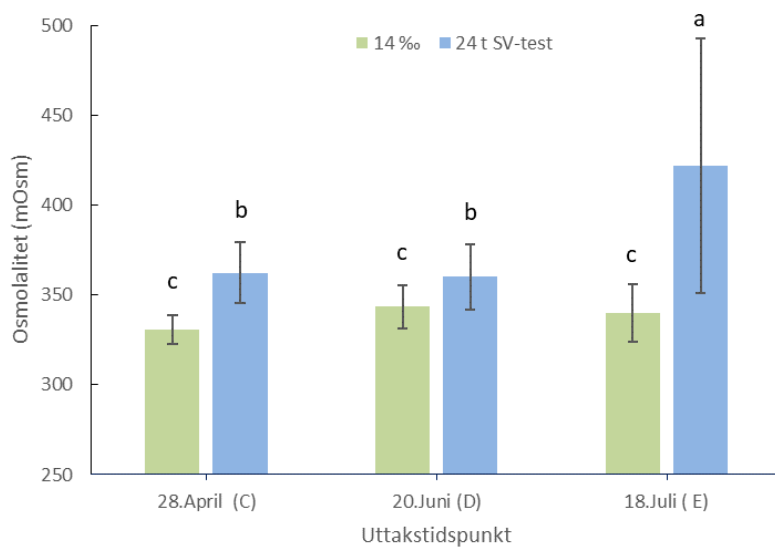
Alle tre uttak viste signifikant høyere kloridverdier etter gjennomført sjøvannstest. Høyeste og laveste gjennomsnittlige kloridnivå i blodplasma etter sjøvannstest var henholdsvis 171 mM ($\pm 32,5$) i uttak E og 123,9 ($\pm 10,53$) i uttak C (Figur 21).



Figur 21: Figuren viser gjennomsnittlig kloridverdier i blodplasma i fisken fra produksjonskar (14 ‰, n=45) samt fra sjøvannstest gjort ved samme uttak (n=45). Grupper med ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom og innad uttak. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

3.8.2 Plasmaosmolalitet

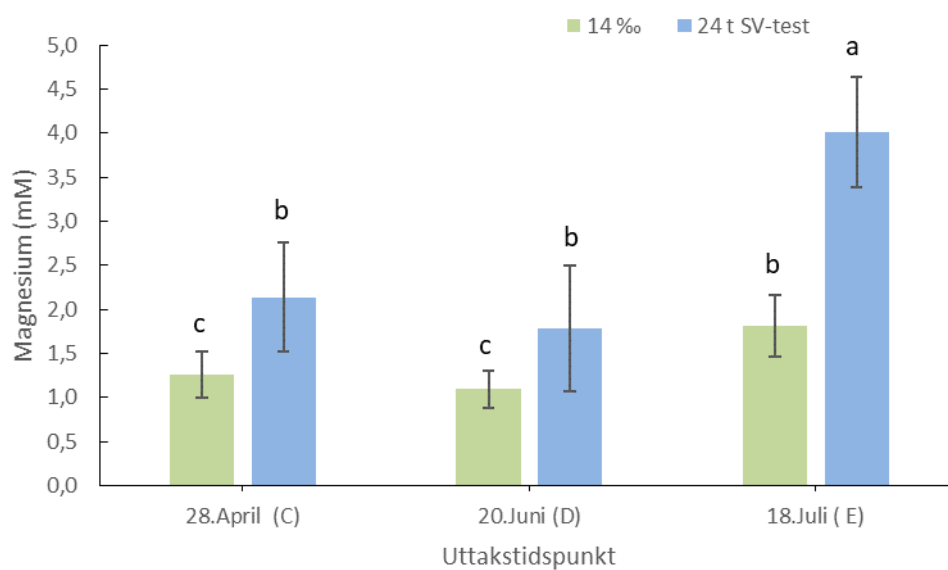
Alle tre uttak viste signifikant høyere osmolalitetsverdier etter gjennomført sjøvannstest. Høyeste og laveste gjennomsnittlige osmolalitetsverdi i blodplasma etter sjøvannstest var henholdsvis 421,79 mOsm ($\pm 70,78$) i uttak E og 360,05 mOsm ($\pm 18,40$) i uttak D. Osmolaliteten etter sjøvannstest på uttak E var signifikant høyere enn etter sjøvannstesten i uttakene C og D. Disse to viste ingen signifikant forskjell ($p=1,00$). Differansen i osmolalitet mellom fisken fra sjøvannstest og 14 ‰ produksjonskar på uttak E var 82,41 mOsm (Figur 22).



Figur 22: Figuren viser gjennomsnittlig osmolalitet i blodplasma i fisken fra produksjonskar (14 ‰, $n=45$) samt fra sjøvannstest gjort ved samme uttak ($n=45$). Grupper med ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom og innad uttak. Standardavvik er illustrert med vertikale streker.

3.8.3 Plasmamagnesium

Alle tre uttak viste signifikant høyere magnesiumverdier etter gjennomført sjøvannstest. Høyeste og laveste gjennomsnittlige magnesiumnivå i blodplasma etter sjøvannstest var henholdsvis 4,0 mM ($\pm 0,61$) i uttak E og 1,8 ($\pm 0,71$) i uttak D. Magnesiumnivået etter sjøvannstest på uttak E var signifikant høyere enn etter sjøvannstesten i uttakene C og D. Disse to viste ingen signifikant forskjell ($p=0,058$). Differansen i magnesiumverdier mellom fisken fra sjøvannstest og 14 ‰ på uttak E var 2,19 mM (Figur 23).



Figur 23: Figuren viser gjennomsnittlig magnesiumverdier i blodplasma i fisken fra produksjonskar (14 ‰, $n=45$) samt fra sjøvannstest gjort ved samme uttak ($n=45$). Grupper med ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom og innad uttak. Standardavvik

3.9 Dødelighet etter sjøutsett

Fisken ble satt i sjø ved fire ulike sjølokaliteter. Disse rapporterte om ulik grad av dødelighet for fisken 30 dager, 60 dager, 90 dager og 120 dager etter sjøutsett (Tabell 4). Det ble registrert dødeligheter på mellom 1,03 % og 2,78 %.

Tabell 4: Tabellen viser akkumulert dødelighet i prosent antall dager etter sjøutsett for fiskegruppen ved de ulike sjølokalitetene de ble satt ut på.

Sjølokalitet	Utsettsdato	30 dager	60 dager	90 dager	120 dager
Hjellberget	28.07.2017	2,09	2,42	2,63	2,78
Kvalvika	27.08.2017	1,03	1,24	1,45	1,65
Lian	09.08.2017	1,74	1,97	2,21	2,41
Storstrompan	11.08.2017	1,63	1,83	2,08	2,30
Gjennomsnitt hele gruppen		1,62	1,87	2,09	2,29

4. Diskusjon

Det er avgjørende for smoltens videre vekst og overlevelse at overføringen til sjøvann gjøres på riktig tidspunkt. I kommersiell produksjon av laksesmolt brukes ulike metoder for å avgjøre om fisken er smoltifisert og klar til å settes i sjø. Prøveuttakene i denne undersøkelsen er gjort på parr og smolt underveis i produksjonssyklusen på settefiskanlegget. På den måten har man fulgt generasjonen for å kunne observere og dokumentere smoltifiseringstrekk i en produksjonssyklus med utelukkende 24L:0M lysregime. Det ble ikke opprettet noen kontrollgruppe med et annet lysregime. I så måte er oppgaven et kartleggings- og dokumenteringsarbeid av de fysiologiske og morfologiske responser hos fisken gjennom 24:0 lysregime. Ulempen med fravær av kontrollgruppe gjør at man ikke kunne teste for ulikheter og likheter mellom forskjellige lysregimer, mens fordelen var et lettere gjennomførbart forsøk hvor man direkte kunne ta uttak av fisk i settefiskanlegget uten behov for større fasiliteter til kontrollgruppe. Samtidig ville det vært vanskelig å gjenskape identiske vekstforhold i laboratorieskala, med tanke på å lage en kontrollgruppe. Som sammenlikningsgrunnlag blir resultater fra tidligere undersøkelser brukt, da med det tatt i betraktning at miljøbetingelsene rundt er forskjellig fra denne undersøkelsen.

Hvilke typer prøver og analysemetoder som skulle brukes ble valgt med den hensikt å gjenspeile de metodene som brukes for å dokumentere smoltifisering og sjøvannstoleranse i kommersielt oppdrett av Atlantisk laks i dag. Det ble ikke tatt gjelleprøver for NKA-enzymaktivitetsanalyse eller NKA mRNA-utrykksanalyse fra fisken i sjøvannstest. Dette ville vært en fordel, da man kunne observert en mulig respons på overføring til sjøvann. En nedregulering er i tidligere undersøkelse observert på gjelle mRNA-uttrykk av NKA α 1a hos Atlantisk laks etter overføring til sjøvann (Nilsen et al., 2007).

Ved hvert prøveuttak ble det tatt prøver av 15 fisk fra tre ulike kar, dette for å unngå pseudoreplikasjon. Sinnott (2001) foreslo ett uttak av 30 fisk per gruppe/populasjon i oppdrett av laks for at resultatene skulle være pålitelig. I dette tilfellet er det tatt prøver fra 45 fisk. Selv om dette er lavt i forhold til antall fisk i karene, anses det som et tilstrekkelig antall for å få pålitelige og representative resultater. Det ble forsøkt å prøveta alle deler av karet for å bedre representativiteten. Dette ble vanskeligere desto større karet var.

4.1 Hovedfunn

Sjøvannstester gir et bilde av fiskens evne til å takle sjøvann over en bestemt periode. Man kan observere overlevelse og atferd i en slik test, eventuelt kombinere det med prøveuttak (Heggberget et al., 1992). I dette forsøket ble 24 timers sjøvannstester utført etterfulgt av blodprøver som ble analysert for klorid, magnesium og osmolalitet. Disse viste forhøyede verdier ved alle uttak i forhold til fisken som ikke var satt i sjøvann. Sjøvannstest uttak E (Juli) viste en dødelighet på 17%, mens sjøvannstester ved uttak A og B ble avsluttet før 24 timer var gått på grunn av tidlig og svært høy dødelighet. NKA enzymaktivitet viste økning fra første til siste uttak, noe som samsvarer med hva som vanligvis observeres hos smoltifiserende atlantisk laks (Christensen et al., 2018; Heggberget et al., 1992; McCormick, 2013). Målinger av NKA enzymaktivitet forteller ikke hvilke av isoformene (NKA α 1a ;ferskvannsisoformen/ NKA α 1b:saltvannsisoformen) som er mest utbredt. En mRNA-uttrykksanalyse av gjelle NKA kan gi en framtidig indikasjon på dette, ettersom man undersøker hvor mange genkopier som lages. Differansen i mRNA-uttrykk mellom de to isoformene varierte gjennom forsøksperioden med en økning mot slutten. Saltvannsisoformen hadde høyeste relative mRNA-uttrykk i forhold til uttak A ved uttak B-E. Dette samsvarer med hva som normalt observeres gjennom et smoltifiseringsforløp hos atlantisk laks (Heggberget et al., 1992; McCormick, 2013; Nilsen et al., 2007). Morfologisk viste en del av fisken tegn på smoltifisering tidlig i forsøksperioden. Signifikant økning i vekst ble observert i alle perioder mellom prøveuttak. Dødeligheten var under 3 prosent i første periode etter overføring til sjøanlegg.

4.2 Vekst

En av fordelene med en produksjonssyklus bestående av kontinuerlig lys er at fisken unngår reduksjonen i vekst perioden med vintersignal gir. Det er imidlertid hevdet at kontinuerlige lysregime kan gi tvilsom smoltkvalitet ved utsetting i sjø, hvor synkroniseringen av de viktige delene av smoltifiseringsprosessen er forstyrret. Slike «pseudo-smolt» er bare delvis smoltifisert, noe som kan føre til dårlig fysiologisk funksjon, stress og smerte om disse settes i sjøvann (Stefansson et al., 2005). Tidligere undersøkelser har også vist dårligere vekst i sjøfase for smolt utsatt for kontinuerlig lys i ferskvannsfasen, i forhold til smolt utsatt for naturlig fotoperiode (Handeland & Stefansson, 2001).

Gjennom smoltifiseringsprosessen hos laks i vill tilstand utvikler fisken ofte en slankere kroppsfasong og dermed lavere kondisjonsfaktor (McCormick, 2013; Staurnes et al., 1992). En

reduksjon i k-faktor forekommer normalt også hos oppdrettssmolt, om ikke i like stor grad (Stefansson & Hansen, 1998). I dette tilfellet steg gjennomsnittlig k-faktor mellom uttak A og E med 0,145. Denne økningen var også signifikant. Dette står i kontrast til hva som normalt observeres hos smoltifiserende laks, som for eksempel Handeland et al., (2004) og (Sigholt et al., 1998) observerte. Mellom uttak C og D ble det observert en svak ikke-signifikant nedgang i k-faktor. Hvorvidt denne nedgangen skal tolkes i noen retning er usikkert, da årsakene kan være mange. Slike «avbrudd» i en jevn økning eller fall i k-faktor er også observert tidligere (Handeland & Stefansson, 2001; Handeland et al., 2004). K-faktor økte signifikant mellom uttak D og E. Hos atlantisk laks i vill tilstand øker ofte k-faktor i løpet av våren for parr som ikke smoltifiserer (McCormick, 2013). Hvis man bruker k-faktoren som en del av vurderingsgrunnlaget for å avgjøre om fisken er smoltifisert, kan det i dette tilfellet gi indikasjoner på fravær av smoltifisering. Å vektlegge k-faktor i en slik vurdering bør gjøres med forsiktighet, da spesielle kombinasjoner av temperaturregimer og fôringsrytmer kan føre til at den forventede nedgangen ikke kommer (Stefansson & Hansen, 1998). Kontinuerlig 24 timers lysregime sammen med spesialfôr (supersmolt), har også vist seg å gi en jevn økning eller fravær av nedgang i k-faktor (Europharma, 2016).

Sigholt et al (1998) observerte svak økning i kondisjonsfaktor mellom april og juni for 1+smolt med størrelse >100g. Dette var fisk holdt på kontinuerlig lys og høy temperatur (13,7 °C). Dette samsvarer med hva som ble observert i denne undersøkelsen.

I de to første periodene var spesifikk vekstrate (SGR) henholdsvis 4,58 og 3,84 (Figur 11). Sammenliknet med verdier for oppdrettet atlantisk laks i sjøfase (0,8 – 1) (Johnsen, 2006) er dette høye verdier. Da SGR er prosentvis daglig tilvekst, vil en liten fisk ha høyere SGR enn en større fisk forutsatt normal vekst. Dette fordi stoffskiftet i mindre fisk er høyere pr gram kroppsmasse. Dette gjør at mindre fisk har et potensiale for større relativ vekst enn større fisk (Clarke & Johnston, 1999). SGR er en størrelses-uavhengig vekstberegning. Lik prosentvis daglig tilvekst mellom stor og liten fisk, krever at den største fisken har en urealistisk prosentvis høy vekst. Det er derfor ikke anbefalt å bruke SGR til å sammenlikne vekst mellom to grupper fisk av ulik størrelse. Handeland og Stefansson (2001) observerte økt vekst hos smolt i ferskvann som gikk under 24:0 lysregime i forhold til naturlig fotoperiode, mens samme fisk hadde betraktelig redusert SGR etter overførsel til sjøvann. Fisken i dette forsøket ble overført fra 0 ‰ til 5 ‰ mellom uttak A og B, mens den sto på 14 ‰ ved uttak C. I perioden mellom uttak C og D var SGR falt til 1,87. Dette kan ha en sammenheng med at fisken var blitt større,

noe som gjør at en normal daglig tilvekst blir lavere i prosent. Lavere SGR ved økning i salinitet samsvarer med hva Handeland og Stefansson (2001) observerte.

TGC (Thermal growth coefficient) korrigerer vektøkning for fisk i en periode opp mot gjennomsnittstemperatur for samme periode. Dermed kan man sammenlikne vekst mellom fiskegrupper holdt på forskjellige temperaturer (Jobling, 2003). Fisken i dette forsøket ble holdt på gjennomsnittlig 14 °C fra uttak A til D, unntatt uttak E hvor temperaturen var 12,6 °C. I siste periode (20 juni-18 juli) var TGC-verdien 0,82 høyere enn perioden før. Det er interessant å se at SGR også stiger i samme periode, men ikke i like stor grad. Det indikerer at nedgangen i temperatur fra 14 til 12,6 °C ikke har negativ innvirkning på vekst (Figur 11). Det er mulig at temperaturreduksjonen ikke er stor nok til å påvirke veksten, ettersom begge temperaturer er nært opptil ideell veksttemperatur for Atlantisk laks (15-16 °C) (Hansen et al., 1998).

Av tre ulike produksjonsstrategier for parr observerte Lysfjord et al., (2004) best vekst i løpet av første måned i sjø hos fisken som ble sjøsatt i september. Dette var 0+ smolt sjøsatt med en gjennomsnittsvikt på 54 g, med sjøtemperatur på 11 °C. Denne fisken hadde da en TGC på 2,69. I siste periode i mitt forsøk hadde fisken en TGC på 2,17 og en gjennomsnittsvikt ved siste uttak på 79 gram. Her var saliniteten 14 ‰ og ikke full sjø som hos Lysfjord et al (2004). Lysfjord et al (2004) konkluderte med at 0+ smolt satt i sjø på høsten ikke ga ulemper i forhold til vekst i første fase i sjø. Dette var fisk som var eksponert for 24:0 lysregime lenger enn 400 døgngrader etter 12:12 lysregime. Dette er en varighet som er ansett som nødvendig for en komplett smoltifisering (Sigholt et al., 1998). Sammen med mine resultater indikerer dette at lysregimer både med og uten vintersignal kan gi god vekst sammen med høye vanntemperaturer.

4.3 Plasmaklorid

Kloridnivået i blodplasma ble målt hos fisk direkte fra kar (0 – 14 ‰) og fra fisk etter gjennomført 24 timers sjøvannstest (33 ‰). Sjøvannstester diskuteres senere i kapitlet.

Gjennomsnittlige plasmakloridverdier var lave i fisk fra produksjonskar ved uttak B (104,2 mM, $\pm 5,9$) og C (103,8 $\pm 5,9$). Dette er lavere enn hva som normalt observeres hos laksefisk i ferskvann (115 -135 mM)(Heggberget et al., 1992). Analysene av plasmaklorid ble kjørt to ganger for å minske sjansene for metodiske feil. Det ble også kjørt en tredje retest utført av laboratorie-tekniker da man mistenkte systematisk for lave verdier. Retesten ga samme resultat.

Høye fisketettheter eller lav vanngjennomstrømning i kar kan føre til CO₂ akkumulering som kan gi negative effekter på Atlantisk laks. CO₂ har høy løselighet i vann og kroppsvæsker, da det reagerer med vann og danner HCO₃⁻ (bikarbonat) og H⁺ (Kristensen, 2013). I ferskvann byttes HCO₃⁻ fra fisken med Cl⁻ fra vannmiljøet rundt. Dette byttingen skjer over kloridcellene på gjellene. Ved høye CO₂ konsentrasjoner i ferskvann blir konsentrasjonen av bikarbonat i fisken forhøyet, noe som reduserer byttefrekvensen mellom klorid og bikarbonat ettersom begge er negativt ladet, og man ikke kan ha overskuddsladning totalt. Opptaket av klorid blir derfor mindre, og kloridnivået i blodplasma reduseres (Staurnes et al., 1998). CO₂ verdiene i vannet ved uttak B og C var 9 mg/l. For oppdrett av smolt i ferskvann er 10-20 mg/l foreslått som øvre grense (Staurnes et al., 1998). CO₂ verdiene ved de to første uttakene er altså innenfor hva som er normalt, og det er lite trolig at de lave kloridverdiene kommer av for høye CO₂ verdier.

Da osmolalitätsverdiene var normale samtidig som kloridnivåene var lave ved uttak B og C, kan det tenkes at det er andre osmolytter som fyller dette «tomrommet». Osmolytter er nøytrale organiske forbindelser som bidrar til osmotisk trykk. Dette kan for eksempel være taurin eller sorbitol (Zarate & Bradley, 2007).

Det er i tidligere undersøkelser observert reduserte nivåer av plasmaklorid som følge av ulike behandlingsprosesser på ferskvannstilpasset smolt av atlantisk laks (Iversen et al., 1998). Ved henting av fisk for prøvetaking, ble fisken håvet fra produksjonskar og over i bønne med bedøvelsesvann. Det er rimelig å anta at fisken ble stresset før bedøvelsen begynte å virke, og at dette har vært med på å redusere kloridverdiene i blodplasma. Reduksjon i plasmaklorid som en del av en akutt stressrespons hos fisk i ferskvann er også vist i andre undersøkelser (Liebert & Schreck, 2006). Sammenlikningsverdien svekkes noe av at fisken i uttak B og C sto på henholdsvis 5 ‰ og 14‰.

Nedgang i plasmaklorid før smoltifisering er observert i tidligere undersøkelser (Folmar & Dickhoff, 1980). Ser man på trenden i plasmakloridinnhold over alle uttak, er det mulig at de lave verdiene ved uttak B og C kan være en slik reduksjon.

4.4 Plasmaosmolalitet

Normal osmolalitet for laksefisk i ferskvann er 290 – 330 mOsm, mens i saltvann er den 320-350 mOsm (Heggberget et al., 1992). Ved de tre siste uttakene var saliniteten i produksjonskarene 14 ‰. Hvis fisken ved disse tre uttakene ikke hadde problemer med

osmoreguleringen, kan man anta at de regulerte osmolaliteten til et nivå mellom ferskvannsnivået og saltvannsnivået, anslagsvis 310-340 mOsm. Osmolaliteten for fisken fra de tre siste uttakene var ikke signifikant forskjellig fra hverandre, og var henholdsvis 329 mOsm ($\pm 12,0$) ved uttak C, 337 mOsm($\pm 16,2$) ved uttak D og 340 mOsm($\pm 9,1$) ved uttak E (Figur 13). Dette var verdier som er innenfor det som er normalt, og antyder en fisk uten osmoregulatoriske problemer. For uttak B, hvor saliniteten i produksjonskarene var 5 ‰, var gjennomsnittlig osmolalitet 304 mOsm ($\pm 8,2$). Dette samsvarer med at saliniteten var lavere, og er også innenfor normalverdier for laksefisk i ferskvann. (Arnesen et al., 1998) observerte en osmolalitet på 320 hos smoltifiserende laks i 6 ° C ferskvann. Verdien fra uttak B er lavere enn dette, noe som kan indikere en mer effektiv osmoregulering og muligens startet smoltifiseringsprosess. NKA-enzymaktivitet på fisken fra samme uttak (8,5 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$) ligger rett i underkant av hva som anses som smoltverdi (10 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$) (McCormick, 1993), noe som også kan indikere en smoltifiseringsprosess i startfasen. Fisken i uttak B hadde en gjennomsnittslengde på 8,7 cm. I så fall er dette et unormalt tidlig tidspunkt for smoltifisering og før den normalt observerte størrelsesterskelen på 12-13 cm (McCormick, 2013). Fisken døde i sjøvannstesten, noe som avkrefter smoltifisert fisk.

(Johnsen et al., 2000) undersøkte effekten av fotoperiodemanipulering på utviklingen av sjøvannstoleranse hos arktisk røye (*Salvelinus alpinus*). Fisken som ble utsatt for kontinuerlig belysning mellom 30 januar og 2 juli, hadde økning i osmolalitetsverdier i april, mai og juni. Samme tendens ble observert hos fisken i både sjøvannstester og produksjonskar. Hvorvidt dette er sammenliknbart kan diskuteres da det er to forskjellige arter, men det kan være med på å illustrere effekten kontinuerlig belysning har på utvikling av sjøvannstoleranse hos laksefisk.

4.5 Plasmamagnesium

For beinfisk i ferskvann er magnesium viktig. Mangel kan føre til eksempelvis neurotiske lidelser, dysfunksjonelle muskler eller dårlig vekst. Ferskvannsfisk er primært avhengig av en diett med magnesiuminnhold for å dekke behovet, men tar også opp magnesium direkte fra vannet (Bijvelds et al., 1998). Det totale magnesiuminnholdet (Mg^{2+}) i blodplasma hos beinfisk overskrider sjelden 2 mM. Beinfisk i ferskvann taper ved diffusjon over gjeller og kroppsoverflaten Mg^{2+} til vannmiljøet rundt, ettersom Mg^{2+} konsentrasjonen i ferskvann er under 0,5 mM (Bijvelds et al., 1998). I sjøvann skiller nyrene ut overflødige ioner som er tatt

opp i tarm, deriblant Mg^{2+} , gjennom urin (McCormick, 2013; Redding & Schreck, 1983). Fisken i produksjonskar (14%) hadde gjennomsnittsverdier i plasmamagnesium under 2 mM ved alle uttak (Figur 14). Dette viser god evne til å regulere magnesiumnivået. Eddy & Talbot(1985) observerte økt urinproduksjon gjennom våren hos smoltifiserende laks, samtidig som NKAenzymaktivitet over gjellene var økende. Hvis man antar at økt urinproduksjon innebærer effektiv utskillelse av magnesium, samsvarer dette med resultatene fram til uttak D (Figur 14).

Det var en signifikant nedgang i plasmamagnesium mellom uttak B og C (Figur 14). I samme periode økte saliniteten fra 5 til 14 ‰. Der er i tidligere studier observert salinitetsreseptorer (Polyvalent cation receptor proteins; CaRs) i blant annet mukus og kloridceller på gjeller hos Atlantisk laks. Konsentrasjonsendringer av divalente ioner (Ca^{2+} , Mg^{2+}) i blodplasma fungerer som reguleringssignaler som oppfattes av disse salinitetsreseptorene (Nearing et al., 2002). I så henseende kan den økte utskillelsen observert mellom uttak B og C indikere respons på økt salinitet.

4.6 Gjelle NKA-enzymaktivitet

NKA-enzymet forekommer i høye konsentrasjoner i salt-transporterende kloridceller hos beinfisk. Aktiviteten av dette enzymet er ofte brukt som indikator på smoltifisering hos laksefisk (McCormick, 1993). Verdier over 10 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$ regnes som «smolt verdier» hos Atlantisk laks(MarinHelse, 2017; McCormick, 1993), men det er målt NKA-enzymaktivitet under 8 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$ på utvandrende smolt i vill tilstand. Fisken ved uttak B viste verdier under dette (8,47 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$), mens ved resterende uttak var verdiene over «smoltverdier». Verdien ved uttak B er noe høy hvis man ser det opp mot størrelsen til fisken (gjennomsnitt 7,4 ($\pm 1,15$ gram)). Tidligere målinger av NKA-enzymaktivitet på parr i vill tilstand i ferskvann har vist verdier under 2 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$ (Kristensen., unpubl.data), mens størrelsesmessig smoltifiseringsterskel er tidligere oppgitt å være 20 gram(Stefansson et al., 2005) og 12-13 cm(McCormick, 2013). Enzymaktiviteten ligger altså nært opptil det som anslås som smoltifisert Atlantisk laks, men med en lengde og vekt som er langt mindre enn det som er oppgitt som størrelsesmessig smoltifiseringsterskel. Det vil derfor være noe betenkelig om fisken er smoltifisert ved et så tidlig tidspunkt. Det har blitt spekulert i om de intense oppdrettsbetingelsene fisken går under, med høy temperatur og kontinuerlig lys gjør at fisken utvikler en form for spontan

sjøvannstoleranse (Tom Ole Nilsen., Uni Research, E-post 12.02.18). Ettersom sjøvannstoleranse bare er en av egenskapene som utvikles under smoltifisering, bør man være svært forsiktig med å kalle det en smolt. At fisken døde i sjøvannstest i uttak B, avkrefter teorien om at fisken på dette tidspunktet hadde utviklet en spontan sjøvannstoleranse.

På vill smolt i norske elver er det ved enkelte tilfeller observert NKA-enzymaktivitetsverdier over 15 $\mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$ (Kristensen., unpubl.data). Dette var migrerende smolt på veg til havet, altså fisk som hadde gjennomgått et naturlig smoltifiseringsløp. Verdiene fra uttakene C, D og E er alle over 15 $\text{ADP/mgprotein/time}$, noe som indikerer smoltifisert fisk sammenliknet med verdiene fra smolt i vill tilstand. Stefansson et al.(2012) observerte NKA-enzymaktivitetsverdier over 20 $\text{ADP/mgprotein/time}$ hos vill smolt etter de var ankommet sjøvann. I uttak E har fisken verdier over 20 $\text{ADP/mgprotein/time}$, noe som indikerer smoltifisert Atlantisk laks. Disse var også over størrelsesmessig smoltifiserings terskel. Dette samsvarer med Stefanssons et al (2012) resultater, men står i kontrast til de høye ioneverdiene fra sjøvannstesten ved samme uttak. Disse indikerte at fisken hadde osmoregulatoriske problemer (Figur 21, 22, 23).

(Stefansson et al., 2007) undersøkte effekten av kontinuerlig lys på smoltifisering hos Atlantisk laks. Det ble observert lave verdier av gjelle NKA-enzymaktivitet gjennom våren fra februar til juni for gruppen utsatt for kontinuerlig lys. Høyeste verdi var 12 $\text{ADP/mgprotein/time}$ målt i mai, mens verdien var tilbake på parnivå i juni. Dette står i kontrast til verdiene for uttakene C (28. april), D(20.juni) og E (18. juli) som alle var over 15 $\text{ADP/mgprotein/time}$. Ut i fra dette ser det ikke ut som kontinuerlig lys hemmer NKA-enzymaktivitet, mens (Stefansson et al., 2007) konkluderte med at kontinuerlig lys hemmet nøkkelementer i smoltifiseringsprosessen som eksempelvis NKA-enzymaktivitet. En viktig forskjell som må påpekes er at fisken i Stefansson et al.(2007) sin undersøkelse gikk på ferskvann, mens fisken i denne undersøkelsen har blitt eksponert for gradvis salinitetsøkning opp til 14 ‰. Når man da sammenlikner resultatene kan det vise at det er salinitetsøkningen som stimulerer til økt NKA-enzymaktivitet fra april til juli.

At kontinuerlig lysregime hemmer normal smoltutvikling er observert i flere studier, hvor det blant annet har vist seg som reduksjon eller fravær av økning i gjelle NKA-enzymaktivitet (Berge et al., 1995; Björnsson et al., 1995; Handeland & Stefansson, 2001). Metoden med å måle NKA-enzymaktivitet gir et bilde av saltutskillelsen over gjeller på det gitte tidspunktet. NKA-enzymaktivitet gir ikke et komplett bilde av rollen til dette enzymet ved

sjøvannsoverføring (Richards et al., 2003). Derfor bør man være forsiktig med å sette smoltstatus på fisken kun på bakgrunn av dette resultatet.

Gjelle materialet for NKA-enzymaktivitetsanalysen ble lagret på -80 °C fryser i mer enn 3 måneder. Frysing over tid kan føre til denaturering av proteiner (Arakawa et al., 2001). Det er påvist reduksjon i enzymaktivitet etter 6 uker ved -20°C frysing (Tamiya et al., 1985). I så henseende skulle man anta at enzymaktiviteten ikke var redusert da det ble lagret på -80 °C. Da lagringstiden var lang er det mulig at verdiene resultatet viser er lavere enn hva som var realiteten ved uttakstidspunktet. Dette er observert hos karpefisk hvor ATPase aktiviteten i muskelmyosinfilamenter var redusert etter 16 dager på -20 °C fryser (Akahane et al., 1981).

4.7 Gjelle NKA mRNA-uttrykk

NKA-enzymet består av underenhetene NKA α , NKA β og NKA γ . NKA γ er ikke funnet i beinfisk. NKA β spiller en rolle i forankring av enzymet i cellemembraner. NKA α har flere isoformer, blant annet NKA α 1a og NKA α 1b som er representert på gjellene til atlantisk laks. NKA α 1a har vist seg å være mest utbredt når fisken er i ferskvann, mens NKA α 1b dominerer i sjøvann. (McCormick, 2013; Nilsen et al., 2007). Under utviklingen av sjøvannstoleranse hos smolt ses ofte en 10 folds økning i mengden NKA α 1b (McCormick, 2013). Dette er også sett hos Atlantisk laks i kar-eksperiment hvor relativt gjelle mRNA-uttrykk av NKA α 1a avtar, mens det øker for NKA α 1b (Nilsen et al., 2007). Hos vill Atlantisk laks i Lærdalselva er det påvist det samme (Kristensen., unpubl.data).

Fisken ved uttak B hadde en snittvekt og lengde på 7,4 gram ($\pm 1,15$) og 8,7 cm. Dette er en størrelse hvor man kan anta at fisken er på parr-stadiet. Ser man på relativ endring i gjelle mRNA-uttrykk for NKA α 1b ved dette uttaket viser det en 1,96 folds økning i forhold til uttak A (Figur 16). Dette samsvarer med resultater fra andre undersøkelser, hvor man også har observert relativ økning fram til april hos ung Atlantisk laks (Nilsen et al., 2007; Stefansson et al., 2007).

Ved uttak C var relativt mRNA-uttrykket for NKA α 1b 2,85. Dette var signifikant høyere enn uttak B. (Nilsen et al., 2007) observerte også en ytterligere relativ økning fram til Mai, bare i større grad enn det som ble observert ved uttak C. Dette var Atlantisk laks med en gjennomsnittsvikt over 35 gram, mens fisken ved uttak C veide gjennomsnittlig 16,7 gram.

Dette viser at mRNA-uttrykket for NKA α 1b har økt tidlig i fisken i forhold til det Nilsen et al., (2007) observerte.

Ser man på relativ endring i NKA α 1a viser den en 2,3 folds reduksjon ved uttak B, og en 13 folds reduksjon ved uttak C. Det er hevdet at man ofte ser en 10 folds relativ reduksjon i NKA α 1a mRNA-uttrykk ved smoltifisering (Kjetil Korsnes, BioVivo Technologies AS pers.com 13.04.18). I så fall kan resultatet indikere at fisken smoltifiserer mellom uttak B og C. Her øker også NKA α 1b signifikant, men ikke 10 fold slik det er hevdet under utvikling av sjøvannstoleranse (McCormick, 2013).

I undersøkelsen til Nilsen et al., (2007) gikk fisken på 8 °C, mens fisken ved uttak B, C og D i denne undersøkelsen gikk på 14 °C. Dette er en vesentlig temperaturforskjell, og det er hevdet at økt temperatur øker hastigheten på responsen fra fotoperioden (McCormick, 2013; Staurnes et al., 1992). Når i tillegg fisken gikk på kontinuerlig lys i hele produksjonssyklusen, kan det være sannsynlig at reduksjon i NKA α 1a fram til uttak C er en respons framskyndet av høy temperatur.

(Stefansson et al., 2007) observerte ingen relativ endring i mRNA-uttrykksverdier for gjelle NKA α 1a og gjelle NKA α 1b hos ung Atlantisk laks utsatt for kontinuerlig lys (LL). Dette var i perioden februar til mai. Konklusjonen var at kontinuerlig lys hindret en komplett smoltifisering. Fisken ved uttak C hadde en gjennomsnittslengde og vekt på 11,1 cm og 16,7 (\pm 2,6) gram. Fisken var mindre enn kontrollgruppen til (Stefansson et al., 2007), som hadde gjennomsnittstørrelser fra 14 til 17,1 cm. Disse ble eksponert for simulert naturlig fotoperiode (SNL). Kontrollgruppen viste den forventede nedreguleringen i NKA α 1a og oppreguleringen av NKA α 1b mRNA-uttrykk, det samme som ble observert mellom uttak B og C i vår undersøkelse. Sett opp mot LL-gruppen til (Stefansson et al., 2007) samsvarer ikke resultatene fram til uttak C med disse. Ser man resultatene opp mot SNL-gruppen, viser de at det smoltifiseringsrelaterte splittet i mRNA-uttrykk mellom NKA α 1a og NKA α 1b kommer på et størrelsesmessig tidligere tidspunkt (Figur 17) enn det (Stefansson et al., 2007) observerte.

(Richards et al., 2003) eksponerte regnbueørret for to ulike saliniteter (40‰ og 80‰ sjøvann) og undersøkte genuttrykket av NKA α 1a og NKA α 1b opptil 15 dager etter. 40 ‰ sjøvann tilsvarer en salinitet på ca. 14‰, altså den samme saliniteten fisken i uttak C, D og E gikk på. (Richards et al., 2003) observerte en nedregulering i relativt mRNA-uttrykk for NKA α 1a etter overføring til 40 ‰ sjø, som stabiliserte seg på et lavt nivå i perioden etter. I perioden mellom uttak A og C i vår undersøkelse ble saliniteten i produksjonskarene økt fra 0‰ til 14 ‰. Om

den økte differansen i relativt mRNA-uttrykk mellom NKA α 1a og NKA α 1b fram til uttak C (Figur 16,17) er en respons på økt salinitet kan være en mulighet, i så fall vil det samsvare med reduksjonen (Richards et al., 2003) observerte.

Relativt mRNA-uttrykk av NKA α 1a var signifikant høyere ved uttak D enn uttak C. En analyse av gjelle NKA α 1 mRNA genuttrykk brukes ofte til å predikere en eventuell framtidig sjøvannstoleranse. Hvis man skal tolke verdiene for NKA α 1a på uttak D, viser de kun 2,95 folds reduksjon i mRNA-uttrykk i forhold til A uttaket. Dette er en lav reduksjon i forhold til det som normalt observeres for smolt i juni (Kristensen unpubl.data)(Nilsen et al., 2007), altså ingen god indikasjon på framtidig sjøvannstoleranse. Det er tenkelig at man ser tendensene til en pågående desmoltifisering, slik som (Soivio et al., 1988) observerte på Atlantisk laks. I undersøkelsen til Soivio et al., (1988) sto fisken i brakkvann med høy temperatur, hvor den smoltifiserte 2-4 måneder før normalt sjøutsett-tidspunkt. På tross av en salinitet på 5-6 ‰, desmoltifiserte fisken rundt tidspunkt for sjøutsett, vist gjennom blant annet NKA-enzymaktivitetsanalyse. Høy vanntemperatur og brakkvann er faktorer som også var i vår undersøkelse. I så henseende er desmoltifisering sannsynlig. NKA-enzymaktivitet for uttakene B-E svekker likevel en slik teori.

Ved siste prøveuttak i juli viser relativt mRNA-uttrykk for NKA α 1a en 11,87 folds reduksjon, samt at NKA α 1b holder seg stabilt. Dette samsvarer med tidligere undersøkelser hvor NKA α 1b har høyere relativt mRNA-uttrykk enn NKA α 1a for smolt ved slutten på våren (Nilsen et al., 2007; Stefansson et al., 2012; Stefansson et al., 2007).

Under 40 % av variasjonen i proteinmengde kan bli forklart av variasjon i tilsvarende mRNA (Christensen et al., 2018). I så henseende kan man ikke direkte avgjøre mengden protein som produseres ut fra mRNA nivåer. Den betydelige reduksjonen i relativt gjelle NKA α 1a mRNA uttrykk observert ved uttak C og E (13 fold og 11,9 fold), behøver derfor ikke representere en tilsvarende reduksjon i proteinnivå. Eller økningen i NKA α 1b mRNA-uttrykk representerer nødvendigvis ikke samme økning i proteinnivå.

(Christensen et al., 2018) observerte svak oppregulering av gjelle NKA α 1b mRNA-uttrykk gjennom smoltifisering hos Atlantisk laks (1,5 fold). Dette samsvarer med den svake oppreguleringen som ble observert i vår undersøkelse. (Christensen et al., 2018) målte samtidig proteinnivået av NKA α 1b på gjeller, og så at denne hadde en 30 folds økning gjennom samme periode. NKA α 1b proteinnivå ble ikke målt i vår undersøkelse, men en økning vill være rimelig å anta ut fra det (Christensen et al., 2018) observerte. NKA-enzymaktivitet viste like nivåer og

utvikling som i vår undersøkelse, noe som også forsterker antakelsen om at proteinnivået har hatt en markant økning. (Christensen et al., 2018) sine resultater kan derfor være med å forklare hvorfor vi i vår undersøkelse ser en svak relativ økning i gjelle NKA α 1b mRNA uttrykk men på samme tidspunkt, og i uttakene i etterkant, høy NKA-enzymaktivitet.

På markedet er det flere fiskehelseselskap som bruker gjelle NKA α mRNA-uttrykksverdier som grunnlag for å avgjøre om laksen har smoltifisert. Enkelte bruker da differansen mellom genuttrykket av NKA α 1a og NKA α 1b som indikasjon på fremtidig sjøvannstoleranse (Kjetil Korsnes, BioVivo Technologies AS, pers.com. 30.10.17). Dette forutsetter at NKA α 1b uttrykkes i større grad enn NKA α 1a, noe som er tilfelle ved uttak E. Den høye dødeligheten i sjøvannstesten ved samme uttak er derfor noe overraskende. Uttak D viste lav differanse mellom NKA α 1a og NKA α 1b mRNA-uttrykk. Det kan tenkes at det er virkningene av dette man ser i siste sjøvannstest, da NKA mRNA-uttrykk kan si noe om framtidig sjøvannstoleranse. Den bakenforliggende årsaken til dette kan ha vært utbruddet av Laksepox (*Salmonid gill poxvirus*) i fiskegruppen mellom uttak C og D.

Resultatene for mRNA-uttrykk indikerer at disse kan brukes som et prediktivt verktøy opp mot en smoltfiseringsprosess, men dette bør gjøres ved flere uttakstidspunkter samt i kombinasjon med andre tester.

4.8 Morfologiske smolt-karakterer

En morfologisk fult utviklet smolt har blanke sider, mørk rygg, hvit buk og mørke finner. Parrmerkene er borte og kroppsfasongen er slankere enn hos parr (Hoar, 1988; McCormick, 2013).

Ved uttak A ble det observert 3 ulike utseendemessige versjoner. Dette var brun med parrmerker, blank med parrmerker og blank uten parrmerker. Antallet av disse ble registrert ved de senere uttakene. Ved uttak A var ca. 70 prosent av fisken i kategoriene brun med parrmerker eller blank med parrmerker (Figur 18). Tar man utgangspunkt i PharmaqAnalytic's smoltindeks ville ikke dette kvalifisert til smolt-status. Dette gjenspeiler seg i hva som ble observert i sjøvannstesten i uttak A, hvor dødeligheten var høy allerede tidlig i testen.

31 % av fisken ved uttak A var blank uten parrmerker. Dette var fisk med en gjennomsnittsvekt på 2,7 gram, altså liten av størrelse til å ha utviklet morfologiske smolt-karakterer i forhold til hva som normalt observeres (Finstad & Iversen, 1995; Hoar, 1988; Stefansson et al., 2007).

(Stefansson et al., 2007) observerte ufullstendig utvikling av morfologiske smolt-karakterer hos atlantisk laks utsatt for kontinuerlig lys, i forhold til fisk som fulgte en naturlig fotoperiode. Fisken mistet ikke parrmerker og hadde bare delvis sølvfarging. Dette står i kontrast til hva som ble observert på fisken i uttak E, hvor fullt utviklet smoltdrakt var å se på 100 % av fisken.

Noe som er interessant å bemerke seg, er at kun 6 prosent av fisken produsjonskar på uttak B var brun med parrmerker (Figur 18). 46 prosent var registrert som blank uten parrmerker, altså et utseende som skulle tilsi smoltifisert fisk (McCormick, 2013). Dette står i kontrast til resultatet i sjøvannstesten samt verdiene for NKA enzymaktivitet.

Ved uttak E var alle fiskene blank uten parrmerker (Figur 18, 20), samtidig som NKA-enzymaktivitet ($20, 38 \mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$) var over «smolt-verdi» på $10 \mu\text{mol ADP/mgprotein/time}$ (Figur 15). I den sammenheng ville det vært naturlig å forvente fisk som taklet 24 timer i sjøvann, men resultatet viste en dødelighet på 17 % i sjøvannstesten. Dette viser at vurdering av smoltifiseringsgrad bør basere seg på flere ulike fysiologiske parameter, ikke bare morfologi.

4.9 Sjøvannstester

4.9.1 Plasmaklorid

24 timers 35 ‰ sjøvannstest er best egnet til å avgjøre forskjeller i kort-tids sjøvannstoleranse (Blackburn, 1987). Dette bør tas med i vurdering av utsettstidspunkt til sjø, da fisken skal kontinuerlig oppholde seg i dette vannmiljøet uten å lide. Høyere saliniteter eller økt varighet kan gi et mer utfyllende bilde av sjøvannstoleranse til fiskegruppen. Et eksempel er 96 timer i vann med høyere salinitet enn sjøvann (Staurnes et al., 2001)

I sjøvannstest var temperaturen 8°C ved alle tester, mens i kar var den 14°C utenom siste uttak hvor den var $12,6^{\circ}\text{C}$. Fisken ble dermed eksponert for økt salinitet og redusert temperatur i kombinasjon. Handeland et al.(2000) påviste liten grad av osmoregulatorisk forstyrrelser ved 24 timer sjøvannseksponering med temperatur på $9,1^{\circ}\text{C}$. Dette var fisk akklimert til $9,1^{\circ}\text{C}$ ferskvann, noe ulikt vanntemperaturen i produksjonskar i denne undersøkelsen. Dette indikerer uansett at 8°C vanntemperatur i sjøvannstest er en temperatur som ikke skulle skape store osmoregulatoriske problemer for fisken.

Laksefisk i ferskvann har kloridverdier i blodplasma på 115-135 mM, mens i sjøvann er normale verdier 130-150 mM (Heggberget et al., 1992). I ferskvann er kloridnivået i

fiskeplasma påvirket av CO₂ konsentrasjonen i vannmiljøet, da bikarbonat fra fisken byttes mot klorid fra vannet over gjellene (Staurnes et al., 1998). Se utdypende forklaring i avsnitt 4.3. Et avvik på 20-30 prosent fra disse verdiene vil være en alvorlig forstyrrelse av fiskens ionebalanse (Heggberget et al., 1992). Eksempelvis vil en smolt med 140 mM plasmaklorid i sjøvann få store problemer hvis plasmakloridnivå passerer 168, altså en økning på 20 %. 20-30% endring er klassifisert som en alvorlig forstyrrelse, det er derfor rimelig å anta at mindre endringer enn dette også kan representere et problem for fisken. En fullstendig smoltifisert laks klarer å regulere kloridnivået til tilnærmet normale nivåer i løpet av 24 timers eksponeringstid i sjøvann (33‰), noe en ufullstendig smoltifisert laks vil ha problemer med (Heggberget et al., 1992). Ved sjøvannstest i uttak B døde flere individer, noe som er et åpenbart signal på manglende sjøvannstoleranse.

Ved alle uttak steg kloridverdien signifikant fra kar til sjøvannstest (Figur 21). Ifølge Rosten og Fjellheim (2010) skal en god smolt ha en stigning på 5-10 mM klorid i blodplasma etter en 24 timers sjøvannstest. I alle tilfellene økte kloridverdiene mer enn dette. Ved uttak E var økningen på hele 51 mM. Ved alle sjøvannstestene var temperaturen (8 °C) lavere enn den var i produksjonskarene (14/12,6 °C). Hvorvidt denne temperaturendringen hadde en innvirkning på evnen til skille ut ioner er vanskelig å si. (Staurnes et al., 2001) observerte at smolt akklimatisert til 8 °C i ferskvann regulerte plasma Cl⁻ ned til normale verdier ved sjøvannseksponering med temperaturer fra 5 – 14 °C. Dette var smolt i størrelsen 34-89 gram, som er noe likt størrelsesintervallet på fisken i uttakene C-E (gjennomsnitt 16,3-79 gram). Skal man legge disse resultatene til grunn er det lite tenkelig at temperaturendringen hadde en effekt på ionereguleringen i sjøvannstesten.

Vis man ser på relativ stigning i plasmaklorid mellom produksjonskar og sjøvannstest, hadde uttak D lavest verdi med 18 prosent, mens uttak C hadde 19 prosent og uttak E 42 prosent. Ser man på gjelle NKA-enzymaktivitet for fisken fra produksjonskar ved samme uttakstidspunkt (Figur 15), er denne over 10 µmol ADP/mgprotein/time ved disse tre uttakene. Enzymaktiviteten over gjellene tilsier en effektiv utskillelse av kloridioner, mens differansen i plasmakloridinnhold mellom fisk fra produksjonskar og sjøvannstest står i kontrast til dette. Dette gjelder spesielt uttak E, og kan antyde andre årsaker til redusert sjøvannstoleranse.

Ved endt sjøvannstest i uttak E var 8 av 45 fisk tydelig redusert, en tilstand hvor de lå med buken i opp og viste liten respons på berøring. En videre eksponering for sjøvann ville utvilsomt før til død. Disse 8 representerte en dødelighet på 17%. Den gjennomsnittlige

plasmakloridverdien var høy (171 mM) med høyt standardavvik (32,6 mM) (Figur 21). Det ble tatt blodprøver fra alle de reduserte fiskene, hvor gjennomsnittlig plasmakloridinnhold var 230,7mM, mens gjennomsnittet for ikke redusert fisk var 157,3 mM. Det er åpenbart at fisk som sliter i så høy grad i sjøvann vil ha høyere andel ioner i blodet enn frisk fisk, da all osmoregulering har stoppet. Disse vil derfor trekke opp gjennomsnittet og standardavvik for hele gruppen. Dette kan være med på å svekke representativiteten til det totale gjennomsnittet på 171 mM. På en annen side indikerer dødeligheten på 17 % at fiskengruppen sliter i sjøvannstesten. Magnesiumverdier (figur 23) og osmolalitätsverdier (figur 24) fra samme fisk er også høye, noe som antyder dårlig sjøvannstoleranse. Sigholt et al., (1998) observerte høye plasmakloridverdier samt høy dødelighet hos smolt i juni etter 24 timers sjøvannstest . Dette var 1 +smolt med gjennomsnittsvekt >100 g, utsatt for kontinuerlig lys og vanntemperatur på 13,7 °C. Dette samsvarer med resultatet fra uttak E i dette forsøket, sett bort fra at fisken i dette forsøket oppholdt seg på 14 ‰ mens fisken i Sigholt et al., (1998) undersøkelse sto på ferskvann før sjøvannstest. Ettersom fisken i produksjonskar ved uttak E sto på 14 ‰, skulle man forventet en bedre toleranse ovenfor økning i salinitet, og dermed en bedre hypo-osmoregulerende evne enn hva ionesammensetningen i blodet viste (figur 21,22,23).

Perioden hvor smolten innehar de fysiologiske egenskapene for å klare seg i sjøvann, kalles smoltvindu. Hvis fisken ikke eksponeres for sjøvann innenfor denne perioden, kan den desmoltifisere og dermed miste smoltegenskaper som sjøvannstoleranse og morfologiske trekk(McCormick, 2013). Eksempelvis kan dette observeres som forhøyede verdier av plasmaioner (Handeland et al., 2013a; Stefansson et al., 2008). Dødeligheten og de høye verdiene av plasmaklorid ved sjøvannstest i uttak E kan indikere en pågående desmoltifiseringsprosess.(McCormick, 2013) oppgir 12-13 cm lengde som en størrelsesmessig smoltifiseringsterskel. Etter denne størrelsen kommer de smoltifiseringsrelaterte endringene som respons på den økte fotoperioden. Ved uttak E var fiskens gjennomsnittslengde 18,8cm, altså lengre enn den oppgitte terskelen. I tillegg hadde NKA enzymaktivitet vært høy ved de to foregående uttak, og en nedgang i denne verdien ville være naturlig å forvente på slutten av studiet, ut ifra hva (Handeland et al., 2013a) observerte hos 1+ smolt holdt på kontinuerlig lys og 13 °C.

Den høye enzymaktiviteten (> 10 µmol ADP/mg protein/time) ved uttak E, samt de morfologiske trekkene som tilsier smolt (figur 18), sår tvil om en pågående desmoltifisering som årsak til de høye verdiene av plasmaklorid. I tillegg var saliniteten i produksjonskar 14 ‰, noe som hevdes å hindre desmoltifisering da denne saliniteten skal være tilstrekkelig til at fisken

beholder smoltegenskaper (Svante Brun, pers.com 13.03.17). (Mortensen & Damsgård, 1998) observerte desmoltifisering hos postsmolt holdt på saliniteter $<10\text{ ‰}$, og anbefalte $<15\text{ ‰}$ for å hindre dette. En osmolalitet på 320 mOsm svarer til osmolaliteten til 11 ‰ brakkevann. En laksefisk er altså tilnærmet isoosmotisk (osmolalitet i fisken lik osmolalitet i omgivelsene) ved 11 ‰ saltinnhold i vannet. Dette gjør at fisken må regulere internt ionenivå ved 14 ‰ , ikke i den grad som i full sjø, men fortsatt nok til at vannmiljøet rundt oppfattes som sjøvann. I tillegg aktiveres drikkereflekser for å kompensere for vanntapet påført ved diffusjon (Bœuf & Payan, 2001). Dermed unngås de fysiologiske desmoltifiseringsprosessene. Dette er en teori, og de fysiologiske prosessene bak hvorfor brakkevann hindrer desmoltifisering er lite dokumentert. En annen gevinst ved å bruke brakkevann og ikke sjøvann, er at fisken bruker mindre energi på osmoregulering og dermed har mer til overs til vekst (Bœuf & Payan, 2001).

4.9.2 Plasmaosmolalitet

I sjøvannstester for de tre siste uttakene steg osmolalitetsverdien signifikant ved alle uttakene (Figur 22). Resultater fra andre undersøkelser har vist en topp i osmolalitet mellom 24 og 48 timer etter sjøvannseksponering (McCormick, 2013). I dette tilfellet ble plasmaosmolalitet målt 24 timer etter sjøvannseksponering. Hvis man forventer en topp i osmolalitet mellom 24 og 48 timer etter sjøvannseksponering, vil osmolaliteten stabilisere seg på nivået som ble målt eller øke ytterligere om fisken ble holdt lenger på sjøvann. En ytterligere økning ville mest sannsynlig ført til problemer for fisken, da fisken allerede hadde høye osmolalitetsverdier ved sjøvannstestene (360-441 mOsm). Dette var verdier høyere enn hva som er oppgitt som normalt (Heggberget et al., 1992).

Resultatet fra sjøvannstest uttak E viser en gjennomsnittlig osmolalitet på 441 mOsm. Her var det også stor spredning med et standardavvik på 70 mOsm. Her var det også en dødelighet på 17 ‰ ($N=45$). McCormick & Saunders (1987) rapporterte at beinfisk opprettholder osmolaliteten imellom 290 og 340 mOsm uavhengig av saliniteten i omgivelsene. Lengre perioder med verdier utenom dette ville føre til død. Dette samsvarer med dødeligheten observert i sjøvannstest uttak E. Årsaken til denne dårlige sjøvannstoleransen kan være sammensatt, og det kan være en respons på utbruddet av Laksepox (*Salmonid gill poxvirus*) i fiskegruppen som vises. Virus angriper gjellene, gir respirasjonsbesvær og følgelig redusert evne til ioneutveksling (Hjeltnes et al., 2017).

Ved de to andre sjøvannstestene (uttak C og D), var gjennomsnittet henholdsvis 362 og 360 mOsm. Dette er ikke mye over det som anses som normalt. Standardavviket var 17 og 18 mOsm,

noe som tilsier at mange av fiskene var innenfor normalverdier. Med bakgrunn i dette kan man anta de fleste fiskene i disse to sjøvannstestene regulerte vann og saltbalansen tilfredstillende.

Arnesen et al., (1998) observerte økning fra 320 mOsm til 331 mOsm for smolt overført fra 6 ° C ferskvann til 6 ° C sjøvann. I dette tilfellet var osmolalitätsverdiene målt hos fisken 10 dager etter overføring til sjøvann, mens osmolalitätsverdiene i sjøvann for uttak C, D og E i min undersøkelse er målt etter 24 timer. En topp i plasmaosmolalitet observeres ofte 24-48 timer etter sjøvannseksponering (McCormick, 2013). Det er derfor rimelig å anta at fisken til Arnesen et al., 1998 hadde stabiliserte osmolalitätsverdier, mens fisken fra uttak C, D og E i min undersøkelse ikke hadde det. Fisken til (Arnesen et al., 1998) var utsatt for fotoperiode med vintersignal og viste god sjøvannstoleranse etter ytterligere 20 dager i sjø. Dette står i kontrast til fisken i mitt forsøk som var utsatt for kontinuerlig lysregime samt viste dårlig sjøvannstoleranse i juli (uttak E).

4.9.3 Plasmamagnesium

Mellom uttak D og E steg magnesiumverdiene for fisken i produksjonskar signifikant. Dette samsvarte med signifikant økning til sjøvannstesten for samme uttak. Fisken i sjøvannstest i uttak E hadde en gjennomsnittlig magnesiumverdi i blodplasma på 4 mM. Dette er det dobbelte av hva som normalt observeres hos beinfisk (Bijvelds et al., 1998). Tidligere undersøkelser har pekt på stress (ved høy fisketetthet) som årsak til redusert evne til å regulere magnesium (Iversen, 2013). Det er betenkelig at stress skulle være så utslagsgivende kun ved dette uttaket, ettersom sjøvannstestene ble utført på samme måte ved tidligere uttak. En annen mulighet er respirasjonsproblemer knyttet til utbruddet av Laksepox, og at fisken dermed hadde problemer med å regulere ionenivået som følge av dette. I sjøvann er konsentrasjonen av magnesium 50-100 større enn i fiskeplasma (Redding & Schreck, 1983). Små endringer i gjellepermeabilitet kan derfor gi store utslag i konsentrasjonen av plasmamagnesium. Uansett årsak til de økte magnesiumverdiene ved siste uttak, indikerer verdiene at fisken har problemer med å regulere innholdet av magnesium i blodplasma og dermed har redusert evne til å takle sjøvann.

4.10 Domestiseringseffekt

Mowi og Aquagen er de mest brukte stammene til oppdrett av Atlantisk laks i Norge. Begge har blitt brukt i kommersielt oppdrett av Atlantisk laks i Norge siden starten av 70-tallet. Fisken har blitt avlet på rask vekst, sen kjønnsmodning, filèt-kvalitet og sykdomsresistens (Gjedrem et

al., 1991). Hvordan denne målrettede avlsprosessen har påvirket smoltifiseringsprosessen og evnen til å utvikle sjøvannstoleranse er det gjort få undersøkelser på (Strand et al., 2007).

Det er dokumentert at atlantisk laks av oppdretts-stamme vokser raskere enn vill atlantisk laks (Fleming et al., 2002). GH (Veksthormon) nivåer var høyere i oppdrettslaks enn i villaks. GH spiller en viktig rolle for utvikling av sjøvannstoleranse og stimulerer til lengdevekst under smoltifisering (Stefansson et al., 2008). Ved raskere vekst vil den størrelsesmessige smoltifiseringsterskelen rekkes på et tidligere tidspunkt, noe som i seg selv kan anses som en domestiseringseffekt. Hvorvidt oppdrettet Atlantisk laks smoltifiserer ved mindre størrelse enn tidligere, er vanskelig å si. (Strand et al., 2007) observerte 1 måned tidligere smoltifisering hos Atlantisk laks fra oppdrettsstamme (Aquagen) sammenliknet med vill-stamme av Atlantisk laks (Namsen). Disse to gruppene ble eksponert for samme temperatur og fotoperiode, derfor ble det antatt at forskjellen i smoltifiseringstidspunkt måtte være genetisk betinget da miljøforholdene var like. Selv om oppdrettslaksen smoltifiserte ved lavere alder, hadde den høyere snittvekt ved smoltifiseringstidspunkt.

4.11 Dødelighet etter sjøutsett

Gjennomsnittlig akkumulert dødelighet for hele smoltgruppen etter 30 og 90 dager i sjø var henholdsvis 1,62 % og 2,09 % (Tabell 4). Det har vært et generelt problem med høye dødeligheter i første sjøperiode i norsk lakseoppdrett (Kristensen et al., 2012). De siste 10 årene har dødeligheten gått fra å være høyest i første periode etter utsett til perioden før slakting. Dette kan ses i sammenheng med økende grad av håndtering mot slutten av produksjonssyklusen, som for eksempel lusebehandlinger (Svåsand et al., 2017). I så fall kan man forvente at dødeligheten øker fram mot slakt for fiskegruppen i denne undersøkelsen. I 2015 ble det registrert akkumulert dødelighet med en median rundt 3 % for de 5 siste månedene før slakt, samme tall for de 5 første månedene etter sjøutsett var like under 2% (Svåsand et al., 2017).

For oppdrettslaks i Norge i 2010 og 2011 var gjennomsnittlig dødelighet de første 3 måneder av sjøfasen 5,1 % (Bleie & Skrudland, 2014). I forhold til dette var dødeligheten lav for fiskegruppen i denne undersøkelsen, med en gjennomsnittlig dødelighet på 2,09% 90 dager etter sjøutsett (Tabell 4). Dette er likt Aunsmo et al., (2008) sine kumulative dødelighetstall fra 2006, som var for høstsmolt tre måneder etter sjøutsett. Kristensen et al., (2012) samlet inn dødelighetsstatistikk direkte fra lakseoppdrettere i perioden 1999 til 2006. Sjøsatte smoltgrupper uten diagnostiserte sykdomstilfeller viste stor variasjon i dødelighet 90 dager etter

utsett (0,2 – 44%). Medianen var 2,1 %, noe som samsvarer med gjennomsnitt for akkumulert dødelighet etter 90 dager i denne undersøkelsen. Oppsummert er 90 dagers sjødødelighet for smoltgruppen i denne undersøkelsen noe lavere eller på samme nivå som det som er registrert i norsk lakseoppdrett siden 1999.

«Settefiskrelatert» eller «dårlig smolt» brukes ofte som årsaker på dødelighet i perioden etter sjøutsett (Bleie & Skrudland, 2014; Overrein et al., 2015), uten at det utdypes hva dette innebærer. En ufullstendig smoltifisert laks vil ha problemer med å takle overgangen til sjøvann. Vis smolten ikke mestrer sitt miljø vil risikoen for sykdom også være høyere (Stefansson et al., 2005). Vanntemperatur ved sjøutsett er også en viktig faktor for videre vekst og overlevelse (Stefansson et al., 2005). Laksesmolt overført til 2 °C sjøvann har vist gradvis økning i plasmaosmolalitet over tid, samt lavere overlevelse enn smolt overført til 4 °C og 6 °C (Arnesen et al., 1998). Smolten i vår undersøkelse ble satt i sjøen i juli og august, med sjøtemperaturer rundt 10 °C (Barentswatch, 2018), en temperatur oppgitt som idell i forhold til smoltens fysiologiske tilpasninger ved overgang fra ferskvann til sjøvann. Dette kan være med på å forklare at dødeligheten ikke var høyere.

Hvis smoltgruppen i denne undersøkelsen var usmoltifisert ved sjøutsett, ville det vært naturlig å forvente høyere dødeligheter i første sjøfase enn hva som ble rapportert inn fra sjølokalitetene. En antakelse om at fisken har smoltifisert og har utviklet sjøvannstoleranse er derfor naturlig. Dette står likevel i kontrast til dødeligheten observert i sjøvannstest i uttak E. Det totale antallet smolt i gruppen som ble satt i sjø i juli og august var 5 560 322. 45 fisk ble satt i sjøvannstest i uttak E, og man kan stille spørsmål ved om dette er høyt nok til å gi et representativt bilde. Ved håving av fisk fra produksjonskar kan det tenkes at man kun har fått med svakere individer.

5. Konklusjoner

Hovedproblemstilling:

- *Hvordan påvirker kontinuerlig lysstimuli gjennom hele produksjonszyklusen på settefiskanlegg (LD 24:0) smoltifiseringstrekk hos parr av atlantisk laks?*

Gjelle NKA-enzymaktivitet øker signifikant mellom uttakene A(13.mars), B (6.april), og C(28.april), for deretter å stabilisere seg på et høyt nivå over det som normalt observeres hos smoltifisert Atlantisk laks. Fisken var sjøvannsdyktig ved prøveuttak i april og juni, vist ved plasmaioneinnhold etter sjøvannstester. Den hadde utviklet fullstendig smolt-utseende i juli. En del av smoltgruppen hadde morfologiske smoltkarakterer ved mindre størrelser. Gjelle NKA α 1a og NKA α 1b relativt mRNA-uttrykk viser høy differanse i juli og april, med høyest uttrykk av NKA α 1b. Dette er som forventet hos sjøvannsdyktig smolt. Relativt NKA α 1b mRNA-uttrykk økte imidlertid ikke til nivåer som tidligere er observert hos smoltifisert Atlantisk laks.

Underproblemstillinger:

- *Er metodene som anvendes for å dokumentere smoltifisering hos atlantisk laks i kommersiell sammenheng tilstrekkelige til å avgjøre om fisken kan settes i sjø?*

Resultatene viser at det kun er sjøvannstester med påfølgende plasmaioneanalyser som gir det riktige bilde av smoltens evne til å takle sjøvann, ettersom NKA-enzymaktivitet, NKA mRNA-uttrykk og morfologiske trekk indikerer sjøvannsdyktig, smoltifisert fisk ved uttak E på tross av økt dødelighet. Dette forteller oss at testene som brukes i dag er tilstrekkelige til å avgjøre om fisken er klar til å gå i sjø, men de bør kombineres for å få et komplett bilde av fiskens smoltifiseringsgrad.

- *Fører kontinuerlig belysning gjennom hele produksjonszyklusen til komplett smoltifisering?*

Resultatene viser at fisken har smoltifisert og er sjøvannsdyktig ved uttak C, og at denne utviklingen har skjedd mellom uttak B og C. Fisken har da hatt en vekt mellom 7 gram og 16 gram. Hvorvidt det er kontinuerlige lysregime eller sykdom som var årsaken til høye plasmaioneverdier og dødelighet i sjøvannstest uttak E, ville krevd ytterligere undersøkelser for

å få bekreftet. De lave dødelighetene etter sjøutsett tyder på at fisken tålte overgangen til sjøvann og dermed har gjennomført en komplett smoltifisering før den ble satt i sjø.

Betraktninger rundt hypotesen: Smoltifisering på et tidlig tidspunkt er en utilsiktet effekt av domestisering samt produksjonsbetingelser som kontinuerlig lys (L24:M0), høy vanntemperatur og sjøvannsinnblanding

Man kan spørre seg om det målrettede avlsarbeidet som er gjort på Atlantisk laks samt den intensive måten å produsere laksesmolt på har ført til en fisk som i mindre grad er avhengig av lysstimuli for å smoltifisere. Det kan også spekuleres i om dette initierer smoltifisering på et tidligere tidspunkt enn det som har vært vanlig, noe resultatene i denne undersøkelsen antyder. Man kan anta at resultatene ville sett annerledes ut om det kun ble brukt ferskvann i produksjonssyklusen. Det er også nærliggende å tro at lavere vanntemperatur og bruk av mørkestimuli ville gitt andre resultater, både med tanke på vekst og smoltifiseringstidspunkt. Årsaken til at fisken smoltifiserer på et tidlig tidspunkt i produksjonen er trolig en kombinasjon av målrettet avl (domestisering), sjøvannsinnblanding, L24:0M lysregime og høy vanntemperatur.

Ytterligere undersøkelser er nødvendig for å øke kunnskapen om hvordan kontinuerlig lys og sjøvannsinnblanding påvirker smoltifiseringutvikling hos Atlantisk laks. Går dette på bekostning av fiskens velferd da man i mindre grad bruker de naturlige smoltifiseringsbetingelsene som ferskvann og mørkestimuli kombinert med lave vanntemperaturer?

Litteraturliste

- Akahane, T., Tsuchiya, T., & Matsumoto, J. J. (1981). Freeze denaturation of carp myosin and its prevention by sodium glutamate. *Cryobiology*, 18(4), 426-435.
- Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C., & Carpenter, J. F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 307-326.
- Arnesen, A. M., Johnsen, H. K., Mortensen, A., & Jobling, M. (1998). Acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts to 'cold' sea water following direct transfer from fresh water. *Aquaculture*, 168(1), 351-367.
- Aunsmo, A., Bruheim, T., Sandberg, M., Skjerve, E., Romstad, S., & Larssen, R. (2008). Methods for investigating patterns of mortality and quantifying cause-specific mortality in sea-farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms*, 81(2), 99-107.
- Barentswatch.(2018).
<https://www.barentswatch.no/fiskehelse/locality/10808/2018/15/overview>. Lesedato 13.04.18.
- Berge, Å. I., Berg, A., Barnung, T., Hansen, T., Fyhn, H. J., & Stefansson, S. O. (1995). Development of salinity tolerance in underyearling smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared under different photoperiods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(2), 243-251.
- Bijvelds, M., Velden, J., Kolar, Z., & Flik, G. (1998). Magnesium transport in freshwater teleosts. *The Journal of experimental biology*, 201(13), 1981-1990.
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O., & Hansen, T. (1995). Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during parr-smolt transformation of Atlantic salmon: implications for hypoosmoregulatory ability and growth. *General and Comparative Endocrinology*, 100(1), 73-82.
- Blackburn, J. (1987). Revised procedure for the 24-hour seawater challenge test to measure seawater adaptability of juvenile salmonids. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1515.
- Bleie, H., & Skrudland, A. (2014). Tap av Laksefisk i Sjø. *Rapport fra Mattilsynet*.
- Bœuf, G., & Payan, P. (2001). How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(4), 411-423. doi: [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00268-X)
- Christensen, A. K., Regish, A. M., & McCormick, S. D. (2018). Shifts in the relationship between mRNA and protein abundance of gill ion-transporters during smolt development and seawater acclimation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*.
- Clarke, A., & Johnston, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of animal ecology*, 68(5), 893-905.
- Debes, P. V., & Hutchings, J. A. (2014). Effects of domestication on parr maturity, growth, and vulnerability to predation in Atlantic salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71(9), 1371-1384.
- Duston, J., & Saunders, R. L. (1995). Advancing smolting to autumn in age 0+ Atlantic salmon by photoperiod, and long-term performance in sea water. *Aquaculture*, 135(4), 295-309.
- Eddy, F. B., & Talbot, C. (1985). Urine production in smolting Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 45(1), 67-72.

- Edwards, S. L., & Marshall, W. S. (2013). Principles and patterns of osmoregulation and euryhalinity in fishes. In S. D. McCormick, A. P. Farrell C. J. Brauner.,(Eds) *Fish Physiology*, Vol. 32, Euryhaline Fishes. Amsterdam: Academic Press., 1–44.
- Eurofins. (2018). <https://www.eurofins.no/food-feed-testing/vaare-tjenester/marin-industri/smoltifisering-atpase-analyser/>. Lesedato 07.02.18.
- Europharma. (2016). Smoltkvalitet-mer enn bare 30 dager i sjøen. <http://europharma.no/wordpress/wp-content/uploads/2015/06/Smoltkvalitet.pdf>. Lesedato 05.02.18.
- Europharma. (2018). <http://europharma.no/supersmolt/>. Lesedato 05.02.18.
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Falcon, J., Migaud, H., Munoz-Cueto, J., & Carrillo, M. (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 165, pp. 469-482).
- Finstad, B., & Iversen, M. (1995). Testing av smoltkvaliteten hos laks og sjøørret på smoltproduksjonsanleggene i Eidfjord, Eikesdalen og Lundamo. *NINA Oppdragsmelding*, 341, 1-21.
- Fiskeridirektoratet. (2018). <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Laks-regnbueoerret-og-oerret>. Lesedato 13.02.18.
- Fleming, I. A., Agustsson, T., Finstad, B., Johnsson, J. I., & Björnsson, B. T. (2002). Effects of domestication on growth physiology and endocrinology of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(8), 1323-1330.
- Folmar, L. C., & Dickhoff, W. W. (1980). The parr—Smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids: A review of selected literature. *Aquaculture*, 21(1), 1-37.
- FOR-2008-06-17-822. Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften). <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-822>. Lesedato 20.11.17.
- Fulton, T. (1902). Rate of growth of sea fish. *Scotland Scientific Investigation Rep. Scotland*.
- Gjedrem, T., Gjøen, H. M., & Gjerde, B. (1991). Genetic origin of Norwegian farmed Atlantic salmon. *Aquaculture*, 98(1-3), 41-50.
- Gjerde, B. (1984). Response to individual selection for age at sexual maturity in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 38(3), 229-240.
- Grosell, M. (2010). The role of the gastrointestinal tract in salt and water balance. In: Grosell M., Farrell A P., Brauner C J., (Eds). *The multifunctional gut of fish. Fish physiology*. (Vol. 30, pp. 135-164): Elsevier.
- Hagspiel, V., Hannevik, J., Lavrutich, M., Naustdal, M., & Struksnæs, H. (2018). Real options under technological uncertainty: A case study of investment in a post-smolt facility in Norway. *Marine Policy*, 88, 158-166.
- Handeland, Imslund, A. K., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O., Hosfeld, C. D., Baevefjord, G., Espmark, Å., Rosten, T., Skilbrei, O. T., Hansen, T., Gunnarsson, G. S., Breck, O., & Stefansson, S. O. (2013b). Low light intensity can reduce Atlantic salmon smolt quality. *Aquaculture*, 384-387, 19-24.
- Handeland, & Stefansson. (2001). Photoperiod control and influence of body size on off-season parr—smolt transformation and post-smolt growth. *Aquaculture*, 192(2), 291-307.
- Handeland, Wilkinson, E., Sveinsbo, B., McCormick, S. D., & Stefansson, S. (2004). Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 233(1-4), 513-529.

- Handeland, S. O., Berge, Å., Björnsson, B. T., Lie, Ø., & Stefansson, S. O. (2000). Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at different temperatures. *Aquaculture*, 181(3), 377-396.
- Handeland, S. O., Imsland, A. K., Stefansson, B. T., Imsland, S. O., & Björnsson, S. O. (2013a). Long-term effects of photoperiod, temperature and their interaction on growth, gill Na⁺ + K⁺ -ATPase activity, seawater tolerance and plasma growth-hormone levels in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 83(5), 1197-1209.
- Hansen, T., Stefansson, S., & Mortensen, S. (1998). Temperatur. I: Hansen, Tom. Mortensen, Stein (Red). Oppdrett av laksesmolt. Landbruksforlaget. Oslo.
- Heggberget, T. G., Staurnes, M., Strand, R., & Husby, J. (1992). *Smoltifisering hos laksefisk* (Vol. 031). Trondheim: Norsk institutt for naturforskning.
- Hjeltnes, B., Bornø, G., Jansen, M. D., Haukaas, A., & Walde, C. r. (2017). Fiskehelserapporten 2016. Veterinærinstituttet 2017.
- Hoar, W. S. (1988). The physiology of smolting salmonids. In: Hoar W. S. and Randall D. (Eds) *Fish Physiology*, Vol. XIB. pp. 275–343. New York: Academic Press.
- Houde, E. D., & Schekter, R. C. (1981). Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. *Rapp Proc-verb Re 'un Con inter l'Explor Mer* 178:441–453.
- Huang, T.-S., Ruoff, P., & Fjellidal, P. G. (2010). Diurnal expression of clock genes in pineal gland, and brain and plasma levels of melatonin and cortisol in atlantic salmon parr and smolts. *Chronobiology International*, 2010, Vol.27(910), p.1697-1714, 27(910), 1697-1714.
- Iversen, M., Eliassen, R. A. & Robb D. H. F. . (2013). The effects of Aqui-S vet. sedation during vaccination on survivability, appetite, growth, immunological capacity, primary, secondary and tertiary stress responses in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). .
- Iversen, M., Finstad, B., & Nilssen, K. J. (1998). Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168(1), 387-394.
- Iwama, G. K., & Tautz, A. F. (1981). A Simple Growth Model for Salmonids in Hatcheries. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(6), 649-656.
- Jobling, M. (2003). The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquaculture Research*, 34(7), 581-584.
- Joensen, R. (2016). Hvordan vil Marine Harvest produsere smolt og postsmolt i fremtiden? Presentasjon.Sunndalsøra.26.10.16.
<http://smoltproduksjon.no/Bilder/TidlKonf%202016/8%20Ragnar%20Joensen%20Marine%20Harvest.pdf>. Lesedato 06.04.18.
- Johnsen, C. A. (2006). Fôringsregimets innvirkning på tilvekst og kvalitet i atlantisk laks, (*Salmo salar* L.). Masteroppgave: Høgskolen i Bodø.
- Johnsen, H., Eliassen, R., Saether, B. S., & Larsen, J. (2000). Effects of photoperiod manipulation on development of seawater tolerance in Arctic charr. *Aquaculture*, 189(1-2), 177-188.
- Kittelsen, A., Lekang, O. I., & Fjæra, S. O. (1993). *Settefiskanlegg og klekkeri. I: Fiskeoppdrett : vekstnæring for distrikts-Norge. Gjedrem, Trygve (Red)*. Oslo: Landbruksforlaget.
- Klemetsen, A., Amundsen, P. A., Dempson, J., Jonsson, B., Jonsson, N., O'connell, M., & Mortensen, E. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of freshwater fish*, 12(1), 1-59.
- Kristensen, T. (2013). Water quality in commercial Atlantic salmon smolt production: Effects on fish performance and welfare with special emphasis on hyperoxia. PhD thesis. Norwegian University of Life Sciences, Aas, Norway. Hesis no: 2013:59, ISBN 978-82-575-1159-3.

- Kristensen, T., Haugen, T., Rosten, T., Fjellheim, A., Åtland, Å., & Rosseland, B. (2012). Effects of production intensity and production strategies in commercial Atlantic salmon smolt (*Salmo salar* L.) production on subsequent performance in the early sea stage. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 273-282.
- Liebert, A. M., & Schreck, C. B. (2006). Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology*, 148(2), 195-202.
- LifeTechnologies. (2012). Real-time PCR Handbook. <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf> .Lesedato 15.01.2018.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lysfjord, G., Jobling, M., & Solberg, C. (2004). Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt production strategy affects body composition and early seawater growth. *Aquaculture*, 237(1-4), 191-205.
- Marine, K. R., & Cech Jr, J. J. (2004). Effects of high water temperature on growth, smoltification, and predator avoidance in juvenile Sacramento River Chinook salmon. *North American Journal of Fisheries Management*, 24(1), 198-210.
- MarinHelse.(2017).Foredrag.Kultiveringsmøte.2017.
http://www.kaf.no/Customers/kaf/documents/Dokumenter/2017/Foredrag/Smoltifisering_KAF_2017_Per_Anton_Saether.pdf. Lesedato 20.01.18.
- McCormick, S. D. (1993). Methods for Nonlethal Gill Biopsy and Measurement of Na⁺, K⁺-ATPase Activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(3), 656-658.
- McCormick, S. D. (2001). Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish1. *American Zoologist*, 41(4), 781-794.
- McCormick, S. D. (2013). Smolt Physiology and Endocrinology. In: McCormick, S. D., Farrell, A. P., Brauner, C. J., (Eds.) *Fish Physiology*, Vol. 32, Euryhaline Fishes. Amsterdam, Academic Press, 199-251.
- McCormick, S. D., Björnsson, B. T., Sheridan, M., Eilerlson, C., Carey, J. B., & O'Dea, M. (1995). Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na⁺, K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Comparative Physiology B*, 165(4), 245-254.
- McCormick, S. D., Regish, A. M., & Christensen, A. K. (2009). Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *The Journal of experimental biology*, 212(Pt 24), 3994.
- McCormick, S. D., & Saunders, R. L. (1987). *Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism*. Paper presented at the Am. Fish. Soc. Symp.
- McCormick, S. D., Saunders, R. L., & MacIntyre, A. D. (1989). Mitochondrial enzyme and Na⁺, K⁺-ATPase activity, and ion regulation during parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmon salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 6(4), 231-241.
- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., Moriyama, S., & Björnsson, B. T. (2002). Effects of an advanced temperature cycle on smolt development and endocrinology indicate that temperature is not a zeitgeber for smolting in Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 205(22), 3553-3560.
- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., & Zydlewski, J. D. (1997). Temperature effects on osmoregulatory physiology of juvenile anadromous fish. In *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish* (eds. C. M. Wood and D. G. McDonald), pp. 279–301. Cambridge: Cambridge University Press.

- Mortensen, A., & Damsgård, B. (1998). The effect of salinity on desmoltification in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 168(1-4), 407-411.
- Nearing, J., Betka, M., Quinn, S., Hentschel, H., Elger, M., Baum, M., Bai, M., Chattopadhyay, N., Brown, E. M., Hebert, S. C., & Harris, H. W. (2002). Polyvalent cation receptor proteins (CaRs) are salinity sensors in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9231.
- Nielsen, C., Madsen, S. S., & Björnsson, B. T. (1999). Changes in branchial and intestinal osmoregulatory mechanisms and growth hormone levels during smolting in hatchery-reared and wild brown trout. *Journal of Fish Biology*, 54(4), 799-818.
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L. O. E., Stefansson, S. O., Madsen, S. S., McCormick, S. D., Andersson, E., Björnsson, B. T., & Prunet, P. (2007). Differential expression of gill Na⁺ + K⁺ -ATPase α - and β -subunits, Na⁺ + K⁺ 2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Experimental Biology*, 210(16), 2885-2896.
- Nordgarden, U., Hansen, T., Hemre, G. I., Sundby, A., & Björnsson, B. T. (2005). Endocrine growth regulation of adult Atlantic salmon in seawater: The effects of light regime on plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I, and insulin levels. *Aquaculture*, 250(3-4), 862-871.
- Nordgarden, U., Oppedal, F., Taranger, G. L., Hansen, G. I., Hemre, T., & Nordgarden, T. (2003a). Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) I - Growth and feed conversion ratio. *Aquaculture Nutrition*, 9(5), 287-293.
- Nordgarden, U., Torstensen, B. E., Frøyland, L., Hansen, T., & Hemre, G. I. (2003b). Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) II - β -oxidation capacity and fatty acid composition in muscle tissues and plasma lipoproteins. *Aquaculture Nutrition*, 9(5), 295-303.
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A.-E. O., Nilsen, T. O., & Hordvik, I. (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC molecular biology*, 6(1), 21.
- Oppedal, F., Juell, J. E., Taranger, G. L., & Hansen, T. (2001). Artificial light and season affects vertical distribution and swimming behaviour of post-smolt Atlantic salmon in sea cages. *Journal of Fish Biology*, 58(6), 1570-1584.
- Otero, J., Jensen, A. J., L'Abée-Lund, J. H., Stenseth, N. C., Storvik, G. O., & Vøllestad, L. A. (2011). Quantifying the Ocean, Freshwater and Human Effects on Year-to-Year Variability of One-Sea-Winter Atlantic Salmon Angled in Multiple Norwegian Rivers. *PLOS ONE*, 6(8), e24005.
- Overrein, M., Jensen, I., Seternes, T., & Fredriksen, B. N. (2015). Vaksinerings og smoltifisering av atlantisk laks (*Salmo salar* L.). Betydning av sjøvannstoleranse for mottakelighet for infeksjons pankreas nekrose (IPN). Masteroppgave: UiT The Arctic University of Norway.
- Patogen. (2018). <http://www.patogen.no/vare-tjenester/smolttimer/>. Lesedato 07.02.18.
- Pethon, P., & Nyström, B. O. (2005). *Aschehougs store fiskebok : Norges fisker i farger* (5. rev. utg. ed.). Oslo: Aschehoug.
- PHARMAQanalytiq. (2018). <https://www.pharmaq-analytiq.com/produkter/smoltifisering/>. Lesedato 07.02.18.
- Redding, J. M., & Schreck, C. B. (1983). Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling coho salmon during stress. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(6), 800-807.
- Reimers, E., & Døving, K. B. (1992). *Fiskens fysiologi*. Bergen: John Grieg.

- Richards, J. G., Semple, J. W., Bystriansky, J. S., & Schulte, P. M. (2003). Na⁺/K⁺-ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4475-4486.
- Rosten, T., & Fjellheim, A. J. (2010). Metode for påvisning av smoltstatus hos atlantisk laks. Debattinlegg/kommentar. Tilgjengelig : https://vannforeningen.no/wp-content/uploads/2015/06/2010_799012.pdf. Lesedato 06.02.18.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature protocols*, 3(6), 1101.
- Schoettger, R. A., & Julin, A. M. (1967). Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids: US Fish and Wildlife Service.
- Schrock, R. M., Beeman, J. W., Rondorf, D. W., & Haner, P. V. (1994). A Microassay for Gill Sodium, Potassium-Activated ATPase in Juvenile Pacific Salmonids. *Transactions of the American Fisheries Society*, 123(2), 223-229.
- Sigholt, T., Åsgård, T., & Staurnes, M. (1998). Timing of parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of changes in temperature and photoperiod. *Aquaculture*, 160(1-2), 129-144.
- Sinnott, R. (2001). Carcass quality monitoring at the farm and factory. In: *Farmed Fish Quality*, (Eds.) S. Kestin & P. Warris. Blackwells Scientific, Oxford, pp. 318-334.
- SNL. (2018). Store Norske Leksikon 2018. <https://snl.no/domestisere>. Lesedato 12.02.18.
- Soivio, A., Virtanen, E., & Muona, M. (1988). Desmoltification of heat-accelerated Baltic salmon (*Salmo salar*) in brackish water. *Aquaculture*, 71(1-2), 89-97.
- SSB.(2018).Statistisk Sentralbyrå. <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/elvefiske>. Lesedato 02.04.18.
- Staurnes, M., Nordtvedt, R., & Rosseland, B. O. (1998). Vannkvalitet. I: Hansen, Tom. Mortensen, Stein (Red). *Oppdrett av laksesmolt*. Landbruksforlaget. Oslo.
- Staurnes, M., Sigholt, T., & Reite, O. B. (1992). *Smoltifisering (1992). I :Reimers, E., & Døving, K. B (Eds.), Fiskens fysiologi.308-316.* . Bergen: John Grieg Forlag.
- Staurnes, M., Sigholt, T., Åsgård, T., & Baevefjord, G. (2001). Effects of a temperature shift on seawater challenge test performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture*, 201(1), 153-159.
- Stefansson, S., Berge, A. I., & Gunnarsson, G. (1998). Changes in seawater tolerance and gill Na⁺,K⁺-ATPase activity during desmoltification in Atlantic salmon kept in freshwater at different temperatures. *Aquaculture*, 168(1-4), 271-277.
- Stefansson, S., & Hansen, T. (1998). Smoltkvalitet. I: Hansen, T (Red). *Smoltproduksjon i oppdrett*. Landbruksforlaget. Oslo.
- Stefansson, S. O., Björnsson, B. T., Ebbesson, L. O. E., & McCormick, S. D. (2008). Smoltification. In *Fish Larval Physiology*. (eds. R. N. Finn and B. G. Kapoor), pp. 639–681. Enfield, NH, USA: Science Publishers.
- Stefansson, S. O., Bævefjord, G., Handeland, S. O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B. O., Rosten, T., H., T., & Havardsson, B. (2005). Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt. Sluttrapport. Vitenskapskomiteen for mat og miljø.
- Stefansson, S. O., Haugland, M., Björnsson, B. T., McCormick, S. D., Holm, M., Ebbesson, L. O. E., Holst, J. C., & Nilsen, T. O. (2012). Growth, osmoregulation and endocrine changes in wild Atlantic salmon smolts and post-smolts during marine migration. *Aquaculture*, 362-363, 127-136.
- Stefansson, S. O., Nilsen, T. O., Ebbesson, L. O. E., Wargelius, A., Madsen, S. S., Björnsson, B. T., & McCormick, S. D. (2007). Molecular mechanisms of continuous light inhibition of Atlantic salmon parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 273(2-3), 235-245.

- Strand, J. E. T., Johnsen, H. K., & Arnesen, A. M. (2007). Comparison of parr-smolt transformation in hatchery reared offspring of one domesticated and two wild populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 273(2-3), 250-256.
- Sundh, H., Lindström, T. O., Hasselberg-Frank, J., Sundell, L., Nilsen, S. O., Stefansson, S. D., Nilsen, K., & McCormick, K. (2014). Development of intestinal ion-transporting mechanisms during smoltification and seawater acclimation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 85(4), 1227-1252.
- Svåsand, Grefsrud, Karlsen, Kvamme, Glover, Husa, Kristiansen, & (red.). (2017). Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2017. *Fisken og havet. Særnr.:*, 2-2017.
- Svåsand, Karlsen, Kvamme, Stien, Taranger, Boxaspen, & (red.). (2016). Risikovurdering av norsk fiskeoppdrett 2016. *Fisken og havet. Særnr.:*, 2-2016.
- Tamiya, T., Okahashi, N., Sakuma, R., Aoyama, T., Akahane, T., & Matsumoto, J. J. (1985). Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*, 22(5), 446-456. doi: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(85\)90156-7](https://doi.org/10.1016/0011-2240(85)90156-7)
- Taranger, G., Haux, C., Stefansson, S., Bjornsson, B., Walther, B., & Hansen, T. (1998). Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol-17 beta profiles in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 162(1-2), 85-98.
- Thorstad., Whoriskey, F., Rikardsen, A., & Aarestrup, K. (2011). Aquatic Nomads: The Life and Migrations of the Atlantic salmon. In: Aas, Ø., Einum, S., Klemetsen, Anders., Skurdal, Jostein., (Eds.) *Atlantic Salmon Ecology*. Chichester, Wiley-Blackwell, 1-23.
- Urke, H., Arnekleiv, J., Nilsen, T., & Nilssen, K. (2014). Development of seawater tolerance and subsequent downstream migration in wild and stocked young-of-the-year derived Atlantic salmon *Salmo salar* smolts. *Journal of Fish Biology*, 84(1), 178-192.
- Veillette, P. A., White, R. J., & Specker, J. L. (1993). Changes in intestinal fluid transport in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) during parr-smolt transformation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12(3), 193-202.
- Veillette, P. A., & Young, G. (2004). Temporal changes in intestinal Na⁺, K⁺-ATPase activity and in vitro responsiveness to cortisol in juvenile chinook salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 138(3), 297-303.
- Webb, J., Verspoor, E., Aubin-Horth, N., Romakkaniemi, A., Amiro, P. (2007). *The atlantic salmon*. Oxford, UK: Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Zarate, J. M., & Bradley, T. M. (2007). Molecular cloning and characterization of the taurine transporter of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 273(2-3), 209-217.
- Zydlewski, G. B., Haro, A., & McCormick, S. D. (2005). Evidence for cumulative temperature as an initiating and terminating factor in downstream migratory behavior of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(1), 68-78.

Vedlegg 1: Framgangsmåte og innhold ved blanding av kjemikalier til Na⁺, K⁺-ATPase enzymaktivitetsanalyse

SEI buffer:

Sukrose (250mM) Mw=342,30
Na₂EDTA (10 mM) Mw=372,24
Imidazole (50mM) Mw= 68,08
g/mol

For 500 mL:

42,79 g
1,86 g
1,702 g

Tilsett 450 mL DiH₂O. Juster pH
til 7,3 med HCl, tilsett H₂O til 500
mL. Opptil 1 mnd lagring ved 4 ° C.

0,5 % SEID buffer

Na deoxycholate

For 20 mL:

0,1 g

Tilsett 20mL SEI buffer. Opptil 1
uke lagring ved 4 ° C.

Salt løsning

Imidazole (50mM) Mw = 58,08
NaCl (189 mM) Mw=58,44 g/mol
MgCl₂*6H₂O (10,5mM)
Mw=203,30 g/mol
KCl (42mM) Mw=74,56 g/mol

For 500 mL:

1,702 g
5,52
1,07
1,57

Tilsett 450 mL DiH₂O. Juster pH
til 7,5 med HCl, tilsett H₂O til 500
mL. Opptil 3 mnd lagring ved 4 ° C.

Imidazole Buffer (IB)

Imidazole (50 mM) Mw=68,08
g/mol

For 500 mL:

1,702

Tilsett 450 mL DiH₂O. Juster pH
til 7,5 med HCl, tilsett H₂O til 500
mL. Opptil 3 mnd lagring ved 4 °
C.

Phosphoenolpyruvat (PEP)

Phosphoenolpyruvat (21 mM)
Mw=233,99

For 100 mL:

0,491 g

Tilsett 100 mL Imidazole Buffer,
del opp i 10 og 20 mL porsjoner.
Opptil 6 mnd lagring ved -80.

Quobain (Enzymhemmer)

Quobain (10,5 mM) Mw=728,77

For 50 mL:

0,383 g

Tilsett 50 mL Imidazole Buffer,
bland med vann (60 °C) for å løse
opp. Opptil 3 mnd lagring ved 25
°C i mørk flaske.

Assay Mixture (AM)

For 4 mikrolater

Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)	10,80	mg
Adenosine Triphosphate (ATP)	26,71	mg
Pyruvat Kinase (PK)	78,20	µl
Lactic Dehydrogenase (LDH)	24,14	µl
Phosphoenolpyruvat (PEP)	9,23	ml
Imidazole Buffer (IB)	Opptil 65,9 ml	

Tilsett lik mengde av kjemikaliemixture i flaske merket AM og flaske merket AM-O. Tilsett kalkulert mengde IB til flaske merket med AM. Tilsett samme mengde quobain (0,5 mM) til flaske merket AM-O. Kan lagres på kjøler i 2-3 dager ved 4 °C.

Vedlegg 2:

Tabell for gjennomsnittsverdier for alle fysiologiske parameter målt på fisken ved alle uttak.

Uttak nr.	Relativt NKAα1b mRNA- uttrykk	Relativt NKAα1a mRNA- uttrykk	Index	Plasma magnesium	Plasma osmolalitet	Plasma klorid	NKA Enzymaktivitet	K- faktor
A	-	-	2,040				4,590	1,110
B	1,960	-2,310	8,710	1,727	304,091	104,214	8,467	1,117
C	2,850	-12,990	63,060	1,256	327,897	103,878	19,255	1,192
D	1,360	-2,950	8,520	1,096	337,500	132,698	16,137	1,172
E	2,460	-11,780	52,130	1,814	339,378	120,814	20,377	1,253